

LUCIANA ALVES FOGAÇA

MELHORAMENTO GENÉTICO EM *Hemerocallis X hybrida* Hort.

Curitiba, PR

2009

LUCIANA ALVES FOGAÇA

MELHORAMENTO GENÉTICO EM *Hemerocallis X hybrida* Hort.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Francine Lorena Cuquel

Curitiba, PR

2009

AGRADECIMENTOS

A elaboração desta tese contou com a colaboração de pessoas e instituições cujos nomes gostaria de salientar e agradecer:

Ao curso de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade concedida.

A CAPES pela concessão da bolsa aqui no Brasil e concessão de bolsa PDEE (sanduiche).

À secretária do curso de Pós-Graduação Lucimara, por me auxiliar a resolver trâmites burocráticos que surgiram durante o curso.

À professora e orientadora Francine Lorena Cuquel, pelo apoio, incentivo e disponibilidade demonstrada em todas as fases que levaram a concretização deste trabalho.

Ao professor e co-orientador João Carlos Bernal, pelo apoio, sugestões e acompanhamento durante toda a realização deste trabalho.

Ao professor e amigo Ricardo Augusto de Oliveira pela paciência, dicas e sugestões nas análises estatísticas e na versão final da tese.

Ao pesquisador e amigo Antonio Caetano Fernando Tombolato pelas dicas e sugestões.

Ao professor e amigo Wagner Vendrame por ter aceitado me co-orientar e pela ótima convivência que tivemos durante o meu estágio nos EUA.

As professoras Milena de Luna Alves Lima e Giovana Bomfim que contribuíram muito com seus questionamentos e sugestões durante a realização da banca de pré-defesa.

Aos colegas e professores dos cursos de Pós-Graduação em Agronomia, Genética e Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

As amigas Daniele, Maria Emília, Giovana, Michelle, Carlise pelos agradáveis momentos durante essa caminhada.

Ao Dario e Neusa Bergman por terem acreditado na importância deste trabalho e ter aberto as portas de sua empresa.

À todos os funcionários da empresa Agrícola da Ilha, Ltda que ajudaram na concretização deste trabalho.

Aos amigos do Tropical Research and Education Center – TREC: professor Wagner, Carolina e Bruno Vendrame, Ania e Jose, Sikavas, professor Tom, Luiz, Rosemeri, Ana, Kátia, Isaias, Justin, Felipe e Irene, Pamela com quem tive o prazer de conviver e aprender durante minha estadia em Homestead – Flórida.

À amiga Ania Pinares pela paciência e grande ajuda durante as análises citogenéticas e moleculares.

Aos colegas Robert, Tara, Guilherme, Jose, Irene e Pamela pelas dicas e empréstimos de soluções para a realização de algumas análises.

À família Mielke, Stella, Marcelo e Henrique, pelos momentos agradáveis e divertidos que tivemos durante alguns passeios pela Flórida.

Ao professor e pesquisador Marcio Elias do Laboratório de Genética Vegetal – CENARGEN – EMBRAPA pelas dicas e sugestões nas análises moleculares.

À grande amiga Andrea Schmidt pelo apoio, paciência e ajuda nas análises moleculares.

Aos meus pais, Rubens e Edite e minhas irmãs Roseli, Cristiane e Silvia pelo apoio e incentivo.

Ao Marcos, meu grande amor, que sempre esteve comigo me apoiando e ajudando.

À todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ANEXOS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 HISTÓRICO DO HEMEROCALÉ.....	21
2.2 A CULTURA DO HEMEROCALÉ.....	22
2.2.1 Características Morfológicas.....	24
2.3 CARACTERES ENVOLVIDOS NO MELHORAMENTO GENÉTICO.....	28
2.4 ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS.....	29
2.4.1 Herdabilidade.....	30
2.4.2 Correlação Genética.....	31
2.5 SELEÇÃO.....	32
2.6 PROCEDIMENTO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA RESTRITA/MELHOR PREDIÇÃO LINEAR NÃO VICIADA.....	33
2.7 ESTUDOS CITOGENÉTICOS.....	35
2.7.1 Citogenética em Hemerocale.	36
2.8 MARCADORES MOLECULARES.....	36
2.8.1 RAPD.....	37
2.8.2 SSR.....	39
2.8.2.1 Reações Múltiplas de Microssatélites (Multiplex).....	41
2.9 REFERÊNCIAS.....	43
3 Capítulo I – PARÂMETROS GENÉTICOS, CORRELAÇÕES GENÉTICAS E SELEÇÃO DE FAMÍLIAS EM POPULAÇÃO DE HEMEROCALÉ VIA REML/BLUP.....	55

RESUMO.....	56
ABSTRACT.....	57
3.1 INTRODUÇÃO	58
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
3.2.1 LOCAL DA PESQUISA.....	60
3.2.2 HIBRIDAÇÃO.....	60
3.2.3 SEMEADURA.....	64
3.2.3.1 Transplante das plântulas.....	64
3.2.3.2 Manutenção dos canteiros.....	64
3.2.4 CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS.....	65
3.2.5 ANÁLISE GENÉTICA VIA REML/BLUP.....	65
3.2.5.1 Modelo Estatístico 38 – blocos incompletos, vários genótipos por parcela, genótipos não-aparentados.....	66
3.2.5.2 Correlação entre caracteres.....	69
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
3.3.1 HIBRIDAÇÃO.....	71
3.3.2 COMPONENTES DE VARIÂNCIA E PARÂMETROS GENÉTICOS.....	74
3.3.2.1 Seleção de Famílias.....	80
3.4 CONCLUSÕES.....	84
3.5 REFERÊNCIAS.....	85
4 Capítulo II – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE FAMÍLIAS DE HEMEROCALE.....	89
RESUMO.....	90
ABSTRACT.....	91
4.1 INTRODUÇÃO.....	92
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	94
4.2.1 LOCAL DA PESQUISA.....	94
4.2.2 MATERIAL VEGETAL.....	94
4.2.2.1 Transplante das plantas.....	94
4.2.2.2 Manutenção dos canteiros.....	95
4.2.3 CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DAS FAMÍLIAS.....	99
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
4.3.1 SELEÇÃO DAS FAMÍLIAS.....	102

4.3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS FAMÍLIAS SELECIONADAS.....	102
4.4 CONCLUSÕES.....	112
4.5 REFERÊNCIAS.....	113
5 Capítulo III – DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA EM CULTIVARES DE HEMEROCALIS.....	115
RESUMO.....	116
ABSTRACT.....	117
5.1 INTRODUÇÃO.....	118
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	120
5.2.1 CULTIVO DAS PLANTAS.....	120
5.2.2 ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE CITOGENÉTICA.....	120
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	124
5.3.1 METODOLOGIAS PARA PREPARAÇÃO CITOGENÉTICA.....	124
5.3.2 QUANTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA.....	125
5.4 CONCLUSÕES.....	130
5.5 REFERÊNCIAS.....	131
6 Capítulo IV – DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES COMERCIAIS DE HEMEROCALIS ANALISADAS POR MEIO DE MARCADORES RAPD E SSR.....	133
RESUMO.....	134
ABSTRACT.....	135
6.1 INTRODUÇÃO	136
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	138
6.2.1 MATERIAL VEGETAL.....	138
6.2.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	138
6.2.3 MARCADOR RAPD.....	140
6.2.3.1 Análise dos dados.....	140
6.2.4 MARCADOR SSR.....	141
6.2.4.1 Análise dos dados.....	143
6.2.4.1.1 Análise da Diversidade Genética.....	143
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	145
6.3.1 ANÁLISE RAPD.....	145

6.3.2 ANÁLISE SSR.....	147
6.3.2.1 Validação dos pares de iniciadores.....	147
6.3.3 SIMILARIDADE GENÉTICA E DENDROGRAMA DOS GENÓTIPOS....	150
6.4 CONCLUSÕES.....	157
6.5 REFERÊNCIAS.....	158
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	164

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	“Amplified Fragment Length Polymorphism”
AHS	“American Hemerocallis Society”
AP	altura da planta
BLUP	Melhor Predição Linear não Viciada
CF	comprimento de folha
DG	Diversidade gênica
DL	Cruzamento de plantas diplóides
DNA	Ácido desoxirribonucléico
F	Endogamia
FA	freqüência de alelo mais freqüente
FF	formato da flor
HCl	ácido clorídrico
He	Heterozigosidade
IAC	Instituto Agrônomo, Campinas, SP.
IFAS	“Institute of Food and Agricultural Sciences”
IL	Illinois
KA	Kansas
LF	largura de folha
MG	média geral
NA	número de alelos por loco
NBH	número de botões florais por haste
NBP	número de botões florais por planta
NH	número de hastes
NI	número de identificação dos parentais
NPK	Adubo químico contendo nitrogênio, fósforo e potássio
NTSYS	“Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System”
Pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PEV	Variância do erro de predição dos valores genotípicos
PIC	conteúdo informativo de polimorfismo
RAPD	“Random Amplified Polymorphic DNA”
REML	Procedimento de máxima verossimilhança restrita
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
SELEGEN	Sistema Estatístico e Seleção Genética Computadorizada
SEP	Desvio padrão do valor genotípico predito
SNP	“Single Nucleotide Polymorphism”
SNPC	Serviço Nacional de Proteção de Cultivares
SSR	Microssatélites – “Simple Sequence Repeats”
Ta	Temperatura de anelamento
TN	Tennessee
TREC	“Tropical Research and Education Center”
UF	Universidade da Flórida
UPGMA	método da média das distâncias genéticas
UV	Ultra-violeta

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

TABELA 1 - Porte da planta (P), número de botões por haste (NBH), classificação quanto à ploidia, dormência e parentais. Joinville, SC, 2004.....	62
TABELA 2 - Cruzamentos efetuados entre cultivares americanas de hemerocale. Joinville, SC, 2004.....	63
TABELA 3 - Número de flores polinizadas, número de frutos obtidos e porcentagem de fecundação em cruzamentos que consistiram em autofecundações e cruzamentos recíprocos realizados em hemerocale. Joinville, SC, 2004.....	73
TABELA 4 - Estimativa dos componentes de variância e parâmetros genéticos para as variáveis: altura de planta (AP), comprimento de folha (CF), largura de folha (LF), número de hastes (NH), número de botões florais por haste (NBH), número de botões florais por planta (NBP) de 24 famílias de irmãos germanos de hemerocale. Joinville, SC, 2007.....	77
TABELA 5 - Coeficiente de correlação genotípica entre altura de planta (AP), comprimento da folha (CF), largura da folha (LF), número de hastes (NH), número de botões/haste (NBH) e número de botões /planta (NBP) em hemerocale. Joinville, SC, 2007.....	79
TABELA 6 - Valores genotípicos (Vgf) e média geral das 24 famílias de irmãos germanos de hemerocale, para as variáveis: altura de planta, comprimento e largura da folha. Joinville, SC, 2007.....	81
TABELA 7 - Valores genotípicos (Vgf) e média geral das 24 famílias de irmãos germanos de hemerocale, para as variáveis: número de hastes, número de botões florais por haste e número de botões florais por planta. Joinville, SC, 2007.....	82

Capítulo II

TABELA 8 - Características das cultivares de hemerocale utilizadas nas hibridações quanto ao porte da planta (P), número de botões por haste (NBH), cor da flor (CF) e formato de flor (FF). Joinville, SC, 2004.....	96
TABELA 9 - Cruzamentos efetuados entre cultivares americanas de hemerocale. Joinville, SC, 2004.....	99
TABELA 10 - Tabela de descritores de hemerocale (<i>Hemerocallis X hybrida</i> Hort.) com algumas alterações. Joinville, SC, 2007.....	100
TABELA 11 - Fotos e caracterização de flores de famílias de hemerocale com potencial ornamental. Joinville, SC, 2007.....	108

Capítulo III

TABELA 12 - Denominação, procedência e classificação de 13 cultivares de hemerocale quanto ao nível de ploidia de acordo com “American Hemerocallis Society”.....	121
TABELA 13 - Metodologias utilizadas para contagem de cromossomos em cultivares de hemerocale. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.....	122
TABELA 14 - Número cromossômico de 13 cultivares de hemerocale analisadas por meio da técnica de contagem de cromossomos convencional. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.....	126

Capítulo IV

TABELA 15 - Denominação, procedência de 13 cultivares de hemerocale de acordo com “American Hemerocallis Society”.....	139
TABELA 16 - Seqüência dos pares de iniciadores selecionados para hemerocale com as respectivas seqüências repetitivas, amplitudes alélicas (pb), temperaturas de anelamento (Ta). Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009.....	142
TABELA 17 - Painéis multiplex otimizados para análise de hemerocale. Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009.....	143
TABELA 18 - Código e seqüência do iniciador, número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem (%) de bandas	

polimórficas na amplificação do DNA genômico de 13 cultivares de hemerocale por meio do marcador RAPD. Laboratório de Horticultura Ornamental Homestead, FL 2008.....	146
TABELA 19 - Iniciadores SSR selecionados para hemerocale com os respectivos fragmentos esperados, temperaturas de anelamento (Ta) recomendadas, fragmentos observados e temperatura de anelamento (Ta) utilizada. Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009.....	147
TABELA 20 - Frequência alélica (FA), número de genótipos (NG), amostras (A), número de alelos (NA), diversidade genética (DG), conteúdo informativo polimórfico (PIC), heterozigosidade (He) e endogamia (f) para o conjunto de 13 acessos de hemerocale analisados em 10 locos microssatélites. Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009.....	149
TABELA 21 - Matriz de similaridade genética de 13 cultivares de hemerocale baseado em 8 iniciadores de RAPD e no coeficiente de Jaccard. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.....	153
TABELA 22 - Matriz de similaridade genética de 13 cultivares de hemerocale baseado em 10 iniciadores de SSR e no coeficiente de Jaccard. Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009...	153

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

FIGURA 1 - Aspectos morfológicos de hemerocale; (A) touceira; (B) flor; (C) fruto; (D) semente. Joinville, SC, 2004.....	25
FIGURA 2 - Morfologia da planta de hemerocale: raiz adventícia, coroa, folhas, haste floral.....	26
FIGURA 3 - Aspectos morfológicos da flor de hemerocale. Joinville, SC, 2007.....	27

Capítulo I

FIGURA 4 - Abortamento de frutos em plantas de hemerocale. Joinville, SC, 2004.....	72
---	----

Capítulo II

FIGURA 5 - Famílias de hemerocale descartadas baseado nas características das flores. Joinville, SC, 2007.....	102
--	-----

Capítulo III

FIGURA 6 - Diagrama da metodologia de análise citogenética convencional. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.	123
FIGURA 7 - Metáfases de hemerocale em preparações coradas: A. hematoxilina férrica, B. orceína. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL.....	125
FIGURA 8 - Cromossomos mitóticos de hemerocale. A. 'Siloam June Bug'; B. 'Siloam Nugget'; C. 'Cinderella's Dark Side'; D. 'Sugar Candy'; E. 'Siloam Show Girl'; F. 'Snowing Down South', obtidos por meio da técnica de contagem de cromossomos convencional. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.....	128
FIGURA 9 - Cromossomos mitóticos de hemerocale. G. 'Caribbean Snowcap'; H. 'Stolen Treasure'; I. 'Double Cranberry Ruffles'; J. 'Dragons Eye'; K. 'Gentle Sherpherd'; L. 'Cleopatra'; M.	

'Green Spider', obtidos por meio da técnica de contagem de cromossomos convencional. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.....	129
---	-----

Capítulo IV

FIGURA 10 - Perfil de um gel de RAPD utilizando o iniciador OPA-11 em 13 cultivares de hemerocale. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.....	146
FIGURA 11 - Genotipagens em sistema semi-automatizado de locos marcados com diferentes fluorescências 6-fam (azul) e hex (verde) realizadas em 13 acessos de hemerocale. Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009.....	150
FIGURA 12 - Dendrograma de similaridade genética de 13 cultivares de hemerocale, obtido pela análise de agrupamento UPGMA, com base no coeficiente de Jaccard, utilizando marcadores RAPD. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.....	155
FIGURA 13 - Dendrograma de similaridade genética de 13 cultivares de hemerocale, obtido pela análise de agrupamento UPGMA, com base no coeficiente de Jaccard, utilizando marcadores SSR. Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009.....	156

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Altura da planta, largura e tonalidade da folha e número de hastes avaliadas em 15 famílias de hemerocale. Joinville, SC, 2007.....	166
Anexo 2 - Número de botões florais por haste, tipo e diâmetro da flor avaliadas em 15 famílias de hemerocale. Joinville, SC, 2007.....	167
Anexo 3 - Cor da flor, região do olho e coloração do sulco nectanífero avaliadas em 15 famílias de hemerocale. Joinville, SC, 2007.....	168

RESUMO

Esta pesquisa foi desenvolvida com a finalidade de produzir informações sobre aspectos genéticos de *Hemerocallis X hybrida* Hort., para subsidiar o melhoramento genético desta espécie e aumentar a eficiência na obtenção de novas cultivares com características que o mercado vem exigindo. Nela treze cultivares americanas de *Hemerocallis X hybrida* Hort. foram selecionadas quanto ao porte da planta e número de botões florais por hastes, sendo submetidas a autofecundações e cruzamentos recíprocos. Três anos após os cruzamentos, os caracteres altura da planta, comprimento e largura das folhas, número de hastes por planta, número de botões florais por haste e número de botões florais por planta foram avaliados. São apresentadas as correlações existentes entre esses parâmetros, o ganho genético e discutidos os potenciais paisagísticos das famílias. Na caracterização morfológica das famílias foram utilizados 15 descritores, sendo seis de características quantitativas e nove de características qualitativas. Para a avaliação do nível de ploidia dos parentais é apresentada uma metodologia para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas. A diversidade genética dos 13 cultivares foi efetuada utilizando-se marcadores moleculares RAPD e SSR e também foi verificado se a proximidade genética influenciou nos valores obtidos para o ganho genético.

Palavras-chave: floricultura, hemerocale, herdabilidade, ganho genético, nível de ploidia, similaridade genética, RAPD, SSR.

BREEDING IN *Hemerocallis X hybrida* Hort.

ABSTRACT

This research was developed aiming to produce information on genetics aspects of *Hemerocallis x hybrida* (Hort.). This information may be used to assist the breeding program and to increase efficiency in to get cultivars with characters that the market demands. Thirteen American daylily cultivars were selected for plant height and number of floral buds per stem. After selection, crosses were performed consisting of self- and cross - pollinations. In the third year it was evaluated the following characteristics: plant height, length and width of leaves, stem number, number of floral buds per stem and number of floral buds per plant. The correlations between these parameters, the genetic gain and the landscape potential of families are shown. The morphological characters evaluated included: five quantitative characters and ten qualitative characters. For the evaluation of the ploidy level of parents is shown a methodology for obtaining cytological preparations with high frequency of metaphase cells. The genetic diversity among 13 daylilies cultivars was analysed through RAPD and SSR and was found that the proximity genetic influenced the values of the genetic gain.

Key-words: floriculture, daylily, heritability, genetic gain, ploidy level, genetic similarity, RAPD, SSR.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O melhoramento por meio de hibridizações das espécies de *Hemerocallis* também conhecida como hemerocale, teve início no começo do século XX nos Estados Unidos. No Brasil, as hibridizações datam do início dos anos 90 por meio de um convênio firmado entre a empresa Agrícola da Ilha Ltda e o programa de melhoramento do Instituto Agrônômico (IAC). Portanto, por ser um período relativamente recente há a necessidade de ampliação de pesquisas relacionadas ao melhoramento genético dessa espécie.

O mercado consumidor desta espécie busca inovação e características como altura máxima de 70 cm e que produzam grande número de flores. Porém, com o pouco conhecimento da herdabilidade e correlação genética destes caracteres, torna-se difícil para os melhoristas realizarem uma seleção adequada dos progenitores que dêem origem a híbridos com os caracteres desejados. Para se eleger progenitores superiores entre cultivares para os cruzamentos seria de grande utilidade poder prever quais cruzamentos originariam progênies elites, ou seja, progênies recombinantes para as principais características que se desejam melhorar, com média e variâncias genéticas elevadas.

Além dos parâmetros genéticos, o nível de ploidia é outro caractere muito importante que deve ser confirmado antes da polinização, tendo em vista que a diferença de ploidia entre parentais pode causar várias barreiras para o melhoramento. Para o gênero *Hemerocallis* não há muita informação a respeito da ploidia das cultivares. A diferenciação entre diplóides e tetraplóides auxiliaria melhoristas na escolha dos parentais para os cruzamentos.

Além disso, para que um programa de melhoramento alcance um avanço genético é necessário o conhecimento da relação genética existente na população. O conhecimento das relações genéticas entre as cultivares permite selecionar progenitores, assim como avaliar e caracterizar os recursos genéticos disponíveis para fazer uso eficiente da variabilidade genética. Cultivares de *H. X hybrida* Hort. apresentam diversidade morfológica, principalmente para cor, forma e tamanho de flor. No entanto, há pouco conhecimento da variabilidade e estrutura genética da espécie.

Nesse sentido, este trabalho foi conduzido com o objetivo geral tornar o melhoramento de hemerocale mais eficiente. Os objetivos específicos foram:

- 1) Estimar parâmetros genéticos, bem como as correlações entre os caracteres quantitativos, e selecionar famílias com valores genotípicos superiores;
- 2) Caracterizar e selecionar materiais de hemerocale com base em caracteres morfológicos, visando produzir informações que auxiliem a gerar novas cultivares;
- 3) Adequar uma metodologia para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas, quantificar e confirmar o nível de ploidia de 13 cultivares de hemerocale.
- 4) Estimar a diversidade genética entre 13 cultivares de hemerocale por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e SSR (Microsatélites).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DO HEMEROCALÉ

Os primeiros relatos sobre os hemerocales são datados de 2697 A.C., quando Chi Pai escreveu “A Matéria Médica” para o Imperador chinês Huang Ti (MUNSON, 1989). O povo da região utilizava as espécies tanto na medicina, na alimentação, quanto para embelezar os jardins com suas flores (HU, 1968). Os primeiros registros relatam o consumo dos botões florais, os quais eram palatáveis e nutritivos. Na medicina chinesa, a raiz e a coroa eram utilizadas devido ao grande potencial analgésico (GATLIN, 1999; GATLIN e BRENNAN, 2002).

Petit e Peat (2000) citam que em 1500, o hemerocale foi levado para a Europa. Os primeiros registros europeus escritos foram feitos pelos herbalistas Dodonaeus, Clusius e Lobelius, os quais descreveram e ilustraram o hemerocale em 1500. Quando Linnaeus introduziu um novo sistema binomial de nomenclatura em 1753, classificou o hemerocale no gênero *Hemerocallis* da família Liliaceae. A nomenclatura foi alterada por Dahlgren, Clifford e Yeo em 1985. Estes pesquisadores propuseram um novo sistema de classificação em que o hemerocale pertence à família Hemerocallidaceae (PETIT e PEAT, 2000).

Nos séculos XVIII e XIX botânicos e colecionadores como Ernest Wilson, George Forrest, Francis Kindon Waid e Joseph Rock introduziram novas espécies de hemerocale na Europa e América (GATLIN e BRENNAN, 2002). Outros horticultores que tiveram uma contribuição significativa no melhoramento do hemerocale no início do século XX foram Amos Perry e George Yeld, na Inglaterra, e Willy Muller, na Itália (ERHARDT, 1992).

Nesse mesmo período, pesquisas de Albert Steward e Arlow B. Stout tiveram grande impacto sobre o conhecimento de novas espécies dessa planta (GATLIN, 1999; PETIT e PEAT, 2000). Albert Steward, natural da Califórnia, viveu muitos anos na China e enquanto trabalhava na Universidade de Nanking, colecionava e vendia hemerocale (plantas e sementes) para seu amigo Arlow Burdette Stout que morava nos Estados Unidos. Segundo Gatlin (1999) esta conexão teve um enorme efeito na obtenção dos modernos hemerocales. Arlow B. Stout tornou-se a maior autoridade sobre hemerocale, contribuindo para o estabelecimento do entendimento científico da biologia dessa planta, particularmente sobre o florescimento natural, a estrutura

das inflorescências, os tipos de incompatibilidade e causas de esterilidade (GATLIN e BRENNAN, 2002). Stout e Chandler (1933) verificaram que a fertilização em hemerocale é completada num período de 24 horas após a polinização. No mesmo trabalho foram verificados muitos aspectos do comportamento do tubo polínico em flores de hemerocale. De acordo com esses autores, muitos casos de auto-incompatibilidade da espécie ocorrem por meio de secreções do ovário que inibem o crescimento do tubo polínico, impedindo a fecundação.

Em 1930 A. B. Stout formou um rigoroso programa de cruzamentos que abriu as portas para o futuro da hibridização da espécie (PETIT e PEAT, 2000). Stout demonstrou que se podia extrair um “pool” de genes de hemerocale para mudar a qualidade e a intensidade da pigmentação e o padrão de distribuição de cores, e produziu novas combinações (GATLIN e BRENNAN, 2002). Atualmente, os hemerocales encontrados no comércio são em geral híbridos de muitas gerações (GATLIN e BRENNAN, 2002).

As espécies de *Hemerocallis* classificam-se em cinco grupos principais e dentro de cada um são relatadas as possíveis variedades: grupo Fulva (*H. aurantiaca* e *H. fulva*); grupo Citrina (*H. altíssima*, *H. citrina*, *H. coreana*, *H. lilioasphodelus*, *H. minor*, *H. pedicellata*, *H. tumbergii* e *H. yezoensis*); grupo Middendorffii (*H. dumortieri*, *H. esculenta*, *H. exalata*, *H. hakunensis*, *H. middendorffii*); grupo Nana (*H. forrestii* e *H. nana*) e o grupo Multiflora (*H. micrantha*, *H. multiflora* e *H. plicata*) (ERHARDT, 1992). No Brasil as espécies cultivadas encontradas foram *H. flava* (*H. lilioasphodelus* e *H. lutea*) e *H. fulva* (*H. disticha*, *H. flava*, *H. kwanso*, *H. longituba*) (CORRÊA, 1952).

2.2 A CULTURA DO HEMEROCALÉ

Hemerocallis X hybrida Hort., também conhecida como lírio-de-são-josé e hemerocale, é uma angiosperma do gênero *Hemerocallis*, da família Hemerocallidaceae, pertencente à ordem Liliales (ERHARDT, 1992; PETIT e CALLAWAY, 2000). Seu nome foi dado por Linnaeus em 1753, e origina-se do grego *hemero* = dia e *kallos* = beleza, referindo-se a uma de suas mais importantes características: cada flor dura apenas um dia (ERHARDT, 1992; GATLIN, 1999; PETIT e CALLAWAY, 2000). É uma das mais importantes entre os gêneros de

herbáceas perenes ornamentais, nativas do Japão, Sibéria, China e Eurásia (GROSVENOR, 1999; TOMBOLATO, 2004).

Hemerocale é uma espécie ornamental que devido à sua rusticidade, é considerada excepcional para paisagismo, pois possui resistência a períodos de seca, capacidade de adaptação a diferentes tipos de solos, climas e boa resistência a pragas e doenças (TOMBOLATO, 2004).

Tradicionalmente, hemerocale é propagado vegetativamente por meio da divisão de touceira (Figura 1 A), proliferações (brotações da haste floral), cultura de tecido e indução de enraizamento de coroa (KRIKORIAN *et al.*, 1981; MUNSON, 1989; GROSVENOR, 1999; BOTANY, 2004; TOMBOLATO, 2004). Também pode ser propagado por sementes, porém este é um processo lento e não gera indivíduos idênticos à planta-matriz. Essa forma de propagação é utilizada para gerar novos híbridos.

No Brasil, o hemerocale pode ser plantado durante o ano todo, no entanto, os períodos mais indicados são em outubro ou no final da florada. Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, a florada do hemerocale se inicia em outubro prolongando-se até o começo de abril e cada haste pode florescer pelo período de três a seis semanas (TOMBOLATO, 2004). É uma planta de pleno sol, porém adapta-se bem a meia sombra. Quanto ao solo, apresenta bom desenvolvimento em solos bem drenados com textura argilo-arenosa e bom teor de matéria orgânica, com pH na faixa de 5,5 a 7,0 (MUNSON, 1994; GROSVENOR, 1999).

É uma espécie de fácil manejo e apesar de ser uma planta resistente, o controle de água é muito importante. No plantio recomenda-se manter o solo úmido até o estabelecimento da planta, após esse período, a irrigação deve ser efetuada a cada dois ou três dias durante os meses quentes e durante os meses mais frios as regas devem ser reduzidas para duas vezes por semana. A adubação ideal deve ser feita duas vezes por ano, uma adubação deve ser realizada no mesmo período de poda das touceiras a 10 cm de altura (no meio do inverno), para essa adubação sugere-se a formulação 4-14-8, e outra adubação no outono, em meados de março com a formulação 10-10-10. A quantidade de adubo a ser aplicado deve seguir a análise de solo (TOMBOLATO, 2004).

2.2.1 Características Morfológicas

O hemerocale é uma planta perene, herbácea e ereta, variando de 0,30 m a 2,40 m de altura (TOMBOLATO, 2004). Possui ramos ou folhas bem agregadas formando uma touceira (GATLIN e BRENNAN, 2002). A planta pode ser dividida em quatro seções de crescimento distintas: raízes; um pseudobulbo também chamado de rizoma, caule vegetativo ou coroa; folhas e escapos florais também chamado de haste floral (TOMBOLATO, 2004) (Figura 2).

As raízes são longas, delgadas e fibrosas. São leves e bastante densas. Quando novas, as raízes apresentam coloração branca, quando as plantas tornam-se mais velhas estas iniciam um processo de escurecimento podendo variar a tonalidade de amarelo para marrom (GATLIN, 1999; GATLIN e BRENNAN, 2002).

Os rizomas apresentam crescimento horizontal, podendo ser superficiais ou subterrâneos. Possuem elevada capacidade de desenvolver raízes adventícias, emitindo-as ao longo de toda a estrutura, nas diversas direções (GATLIN, 1999; GATLIN e BRENNAN, 2002). A coroa é a zona de transição entre a parte aérea e a parte subterrânea da planta. É a região onde se concentram as gemas que darão origem às folhas acima da superfície do solo, e também às raízes que se encontram abaixo da superfície do solo. Também é dita como uma região muito vulnerável, onde o dano pode causar a morte da planta (ERHARDT, 1992; GATLIN, 1999; PETIT e PEAT, 2000; GATLIN e BRENNAN, 2002).

As folhas estão dispostas cada uma na base, e espalham-se na forma simétrica de um leque, são lineares, sésseis, inteiras e acumuladas. Muitas vezes as folhas podem manter-se eretas, arqueadas ou recurvas (GATLIN e BRENNAN, 2002). A coloração das folhas de hemerocale pode variar de azul-esverdeada para amarelo-esverdeada. O tamanho e a proporção de folhagem se dão em relação à quantidade de flores e escapos florais, que podem ser muito variáveis (GATLIN, 1999).

Existe uma série de diferenças entre as várias cultivares de hemerocale. E uma destas diferenças está relacionada com o comportamento que a folhagem destas plantas apresenta durante o inverno (ERHARDT, 1992; NAU, 1995; GATLIN, 1999, PETIT e PEAT, 2000). O hábito das plantas foi dividido em categorias para simplificar os registros das cultivares. A categoria dormente inclui as plantas que perdem totalmente a folhagem durante o inverno, retornando na primavera. A

categoria sempre – verde, inclui as plantas que mantêm a folhagem durante o ano todo, sendo indicadas para regiões de inverno ameno sem geadas. E por último, a categoria semi-dormiente ou perene que inclui as plantas que perdem parcialmente suas folhas durante o inverno, porém mantêm parte da folhagem verde no nível do solo. São indicadas para regiões de clima ameno com geadas leves. Vale lembrar que as cultivares podem apresentar diferentes comportamentos daquele registrado, visto que se desenvolvem em ambientes diferentes daqueles que foram originados (VÉGIS, 1964).

O escapo floral, ou haste, é ereto, ascendente, liso e usualmente muito maior que as folhas (GATLIN e BRENNAN, 2002). O comprimento da haste pode variar de 0,30 a 2,40 m. Muitas vezes ela não cresce ereta, pode crescer arqueada ou inclinada para baixo, podendo se emitir mais de uma vez, entretanto existem espécies que desenvolve apenas uma haste durante o florescimento (ERHARDT, 1992).

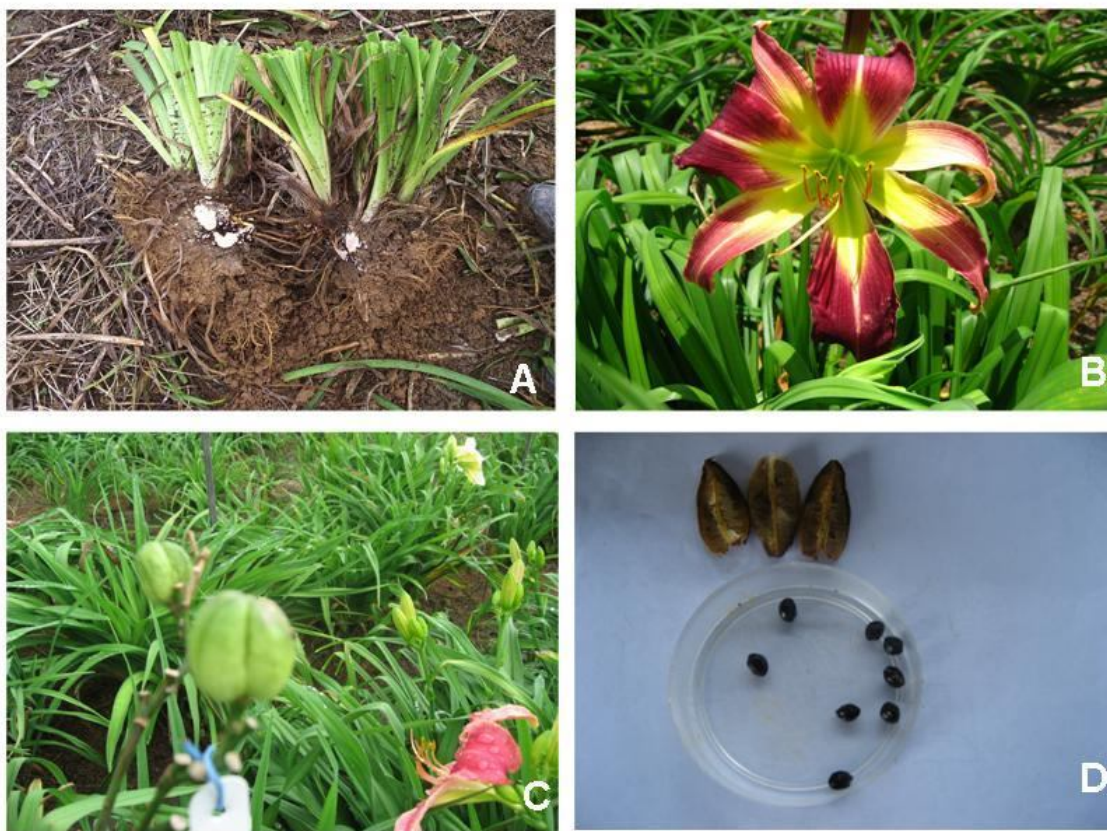


FIGURA 1 – Aspectos morfológicos de hemerocale; (A) touceira, (B) flor; (C) fruto, (D) semente. Joinville, SC, 2004.

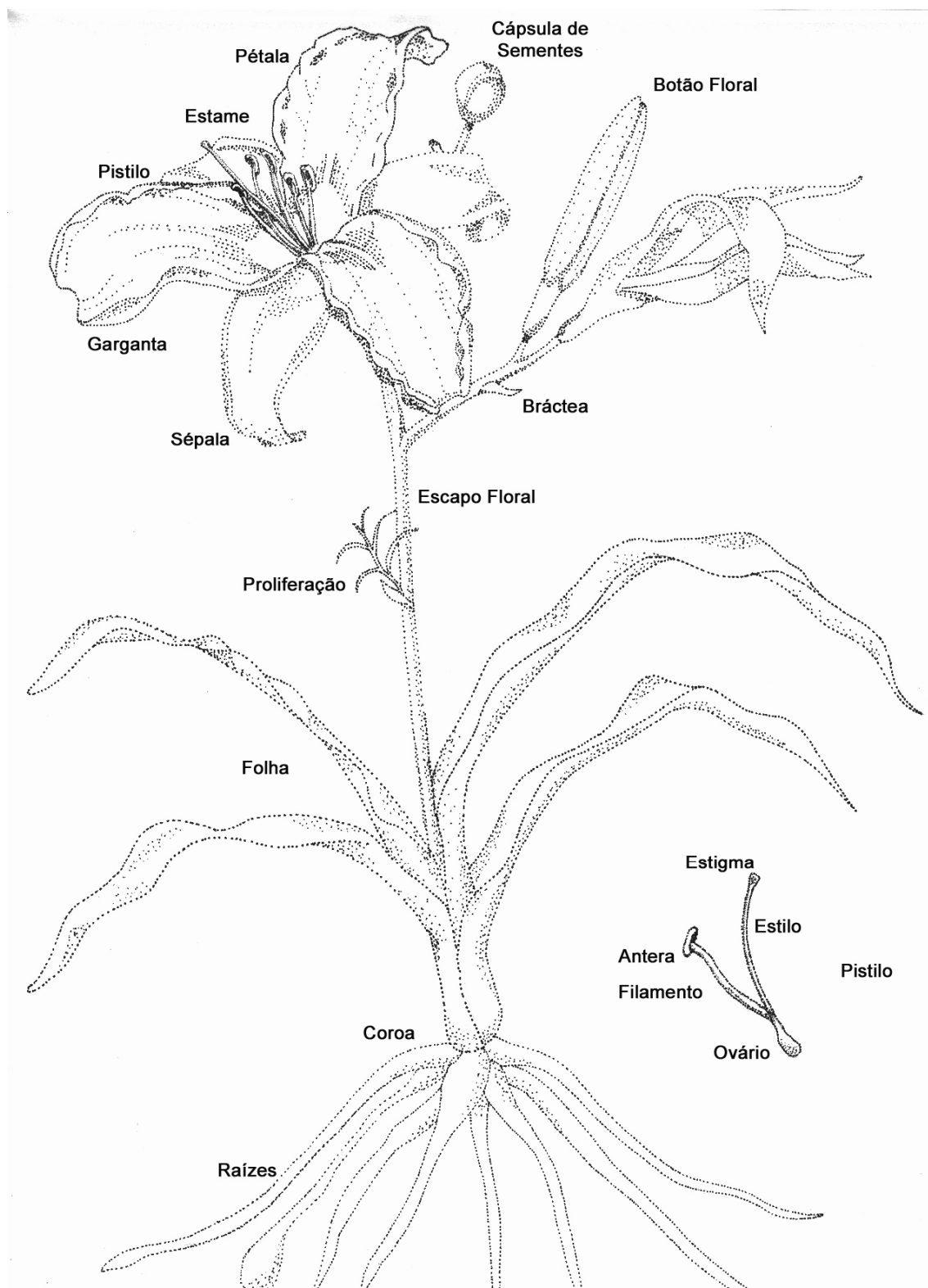


FIGURA 2 - Morfologia da planta de hemerocálide: raiz adventícia, coroa, folhas, haste floral. (Fonte: Gatlin, 1999).

A inflorescência é ramificada, consistindo em uma série de cimóides helicóides uníparos (dicotômicos). As flores são trímeras, com perianto em forma de funil, actinomorfas ou tornam-se bilateralmente simétricas (zigomorfas) em resposta ao geotropismo e fototropismo, são diurnas, sem fragrância ou noturnas que estendem a floração e com fragrância (GATLIN e BRENNAN, 2002).

As flores de *hemerocallis* podem ter de 5 a 20 cm de diâmetro e apresentar diferentes formas e cores. Para fins de classificação, as flores são divididas em seis principais regiões: garganta, zona do olho, pétalas, sépalas, pistilo/ estame e anteras (Figuras 1B e 3) (TOMBOLATO, 2004).

Com relação às formas, podem se encontrar circulares, triangulares, dobradas, polipétalas, estreladas, “spiders” (aranhas), achatadas, trompetes, entre outros detalhes, como linha média, nervuras e bordas. Já as cores naturais das flores são: amarelo, laranja, vermelho com suas variações. Além da cor única, existe uma infinidade de combinações como mistura de cores, policromáticas, dois tons reversos, bicolores e bicolores reversos (NAU, 1995; GATLIN, 1999).

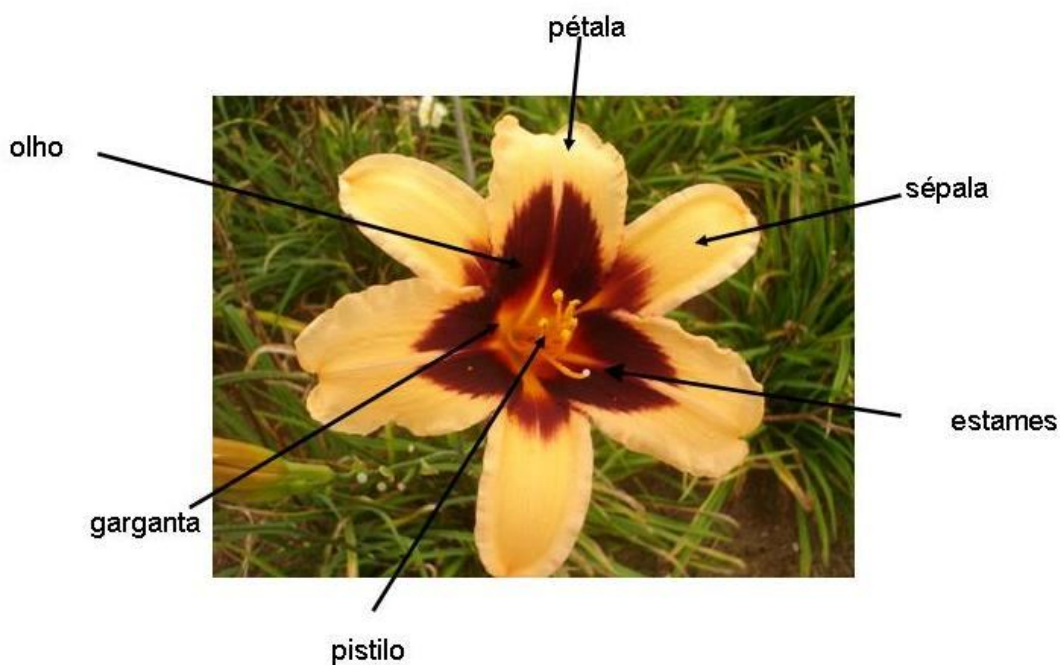


FIGURA 3 - Aspectos morfológicos da flor de *hemerocallis*. Joinville, SC, 2007.

O hemerocale é uma planta hermafrodita, o estame, consiste de seis longos filamentos, de cor principalmente amarela, cada um terminando em uma antera, a qual contém o pólen. Quando estão fechados, as anteras são amarelas ou às vezes acinzentadas e explodem poucas horas após a abertura da flor, expondo os grãos de pólen. No ovário podem existir 42 óvulos, porém nem todos estarão desenvolvidos, conseqüentemente o número de sementes pode ser menor (ERHARDT, 1992; ROOD, 2002). O fruto é em um primeiro momento carnososo, e torna-se seco e deiscente na sua maturidade, é do tipo cápsula, triangular, trilocular, com muitas sementes angulares de cor preta (GATLIN e BRENNAN, 2002) (Figuras 1C e D).

2.3 CARACTERES ENVOLVIDOS NO MELHORAMENTO GENÉTICO

Para o melhoramento por hibridação a escolha dos progenitores, a obtenção da população segregante e o modo como esta é conduzida são fundamentais (RAMALHO *et al.*, 1993). Segundo o mesmo autor para se ter sucesso na escolha dos progenitores, o objetivo do trabalho deve ser claro. Esse objetivo, por exemplo, pode envolver vários caracteres ao mesmo tempo, ou então apenas um ou dois. Quanto maior o número de caracteres envolvidos, menor é a possibilidade de sucesso.

No caso das plantas ornamentais vários caracteres morfológicos ou qualitativos estão envolvidos na escolha dos progenitores tais como: as cores das flores, a distribuição das cores, formas de flores, período de florescimento, durabilidade do escapo floral (PETIT e CALLAWAY, 2000).

Há muitos exemplos de caracteres morfológicos ou fisiológicos bem definidos que são regulados, em grande parte, por um só gene e não são muito afetados pelo ambiente. Alguns caracteres, comercialmente importantes, de muitas espécies cultivadas, são governados por genes cujos efeitos são pronunciados, de fácil identificação e relativamente estáveis. Dentre eles podem ser citados: a cor da flor em plantas ornamentais e a resistência a certas enfermidades (ALLARD, 1971).

Os caracteres quantitativos são poligênicos (controlados por um grande número de genes) apresentam grande número de genótipos e muito susceptível a influências ambientais, além de serem também muito importantes comercialmente no melhoramento seletivo de plantas (ALLARD, 1971). Segundo Langton (1991), o

número e o tamanho das flores, o comprimento do escapo floral, o comprimento e a largura da folha são caracteres quantitativos importantes para plantas ornamentais. O mesmo autor ainda cita que a aparência visual (característica qualitativa) é considerada em todos os estágios do processo de seleção de flores e plantas ornamentais.

Para o *hemerocallis*, os caracteres de importância são o número de escapos florais por planta, o número de flores por escapo floral, a capacidade de adaptação, resistência a patógenos e as características da flor tais como tamanho e tonalidade (CALLAWAY e CALLAWAY, 2000).

2.4 ESTIMATIVAS DOS PARÂMETROS GENÉTICOS

Hibridizações em *hemerocallis* vêm sendo realizadas por muitos anos, porém ainda persiste uma carência de informações sobre diversos aspectos e estudos sobre estimativas dos parâmetros genéticos, etapa esta muito importante para se ter um melhor planejamento de futuros programas de melhoramento genético (TOMKINS, 2001).

As estimativas dos parâmetros genéticos possibilitam prever os ganhos oriundos das estratégias alternativas aplicadas ao melhoramento genético, fornecendo informações importantes à seleção e para a definição do programa de melhoramento da população (PINTO JÚNIOR, 2004).

Os parâmetros genéticos essenciais para o melhoramento de caracteres quantitativos estão relacionados à herdabilidade no sentido restrito (\hat{h}^2_a), a herdabilidade no sentido amplo (\hat{h}^2_g), a repetibilidade (ρ) e as correlações, sejam estas genéticas (r_a) ou fenotípicas (r) entre caracteres. A herdabilidade no sentido restrito refere-se ao coeficiente de determinação do valor genético aditivo pelo valor fenotípico e a herdabilidade no sentido amplo, corresponde ao coeficiente de determinação do valor genotípico pelo fenotípico. Portanto diz respeito sobre a proporção genética aditiva “sentido restrito” e a proporção genotípica “sentido amplo” relativa das influências genéticas e ambientais na manifestação fenotípica dos caracteres (RAMALHO *et al.*, 1993; BORÉM, 1997). Estes parâmetros indicam o grau de facilidade ou dificuldade para melhorar determinados caracteres. Sendo que, para os caracteres de baixa herdabilidade devem ser adotados métodos de seleção mais elaborados. A correlação genética entre caracteres indica o grau de

associação destes caracteres, ou seja, quantifica as influências que determinados caracteres exercem sobre outros caracteres (RESENDE, 2002a).

2.4.1 Herdabilidade

A herdabilidade é um dos parâmetros genéticos que mais contribui para o trabalho do melhorista. Ela fornece a proporção da variância genética presente na variância fenotípica total. Dessa forma, ela mede a confiabilidade do valor fenotípico como indicador do valor reprodutivo (RAMALHO *et al.*, 2004). A mais importante função da herdabilidade no estudo genético do caráter métrico é o seu papel preditivo expressando a confiança do valor fenotípico como um guia para o valor genético, ou o grau de correspondência entre o valor fenotípico e o valor genético (FALCONER, 1987).

Tal qual o coeficiente de variação genética, que é um indicador da magnitude de variabilidade presente nas populações e em diferentes caracteres, a herdabilidade subsidia a escolha da melhor estratégia de melhoramento a ser adotada (ZOBEL e TALBERT, 1984; FALCONER, 1987), mostra claramente o potencial de progresso genético esperado no programa de melhoramento e é essencial à predição de valores genéticos (RESENDE, 2002a).

Em trabalho realizado em crisântemo De Jong (1991) estimou um valor de herdabilidade alto para o caráter número de folhas (83%), indicando que a variância genética excedia a variância não genética, com isso a seleção seria efetiva. Em contrapartida quando se obtém uma estimativa de herdabilidade baixa devido à limitada variância, as espécies devem ser cruzadas com a finalidade de gerar uma nova variação genética assim como Sparnaaij *et al.* (1990) demonstraram em cravos.

As estimativas de h^2 variam com a característica, o método de estimativa, a diversidade na população, o tamanho da amostra avaliada, o número e o tipo de ambiente considerado, a unidade experimental considerada, a precisão na condução do experimento e na coleta de dados (FALCONER, 1987; BORÉM, 1997; BORÉM e MIRANDA, 2005).

Valores altos para as estimativas de herdabilidade indicam boas possibilidades de ganho nos estudos de melhoramento, pois o progresso esperado pela seleção depende diretamente da herdabilidade e da intensidade da seleção, e

inversamente ao desvio padrão fenotípico (DUDLEY e MOLL, 1969). Assim, valores elevados de herdabilidade revelam que o controle genético pode ser alto e que mudanças no ambiente influenciam pouco o fenótipo (SHEPHERD, 1977; FALCONER, 1987).

É relevante enfatizar que a h^2 de um caráter não é uma estimativa imutável. Pelo contrário, ela varia com a variação genética presente e com o efeito do ambiente. É possível, desse modo, aumentar a estimativa de h^2 utilizando população com maior variação genética e também realizando um efetivo controle do ambiente para a variação fenotípica total (FALCONER, 1987). O autor salienta ainda, que a herdabilidade é uma propriedade não somente de um caráter, mas também da população e das circunstâncias do ambiente aos quais os indivíduos estão sujeitos. Uma vez que o valor da herdabilidade depende da magnitude de todos os componentes da variância, uma alteração em qualquer um deles afetará o valor da herdabilidade. Portanto, os componentes da variância, as herdabilidades e, ainda, as acurácias são imprescindíveis na determinação dos métodos mais eficientes de seleção a serem utilizados nos programas de melhoramento (RESENDE *et al.*, 1995).

2.4.2 Correlação genética

Esse recurso de estatística multivariada é comumente empregado quando se deseja selecionar um determinado caráter de difícil medição ou identificação, ou quando este apresenta baixa herdabilidade, porém sabe-se que esse caráter pode se correlacionar fortemente com outros caracteres de fácil observação e com a herdabilidade alta (FALCONER, 1987).

O coeficiente de correlação genética mede o grau de associação genética entre dois caracteres quantitativos em uma determinada população (WILLIAMS e MATHESON, 1995). Este parâmetro denota importância aos programas de melhoramento genético, pois significa que apresentando valores altos, a alteração de um caráter, via seleção, promove alterações significativas em outros caracteres correlacionados a ele (RESENDE, 2002a).

As correlações são medidas-padrão da covariância entre dois caracteres e podem ser estimadas fenotípica ou geneticamente. Define-se correlação genética entre caracteres, como sendo a medida da magnitude da associação genética entre

caracteres de um indivíduo. A correlação fenotípica entre caracteres é definida como a medida de magnitude da associação fenotípica entre caracteres de um indivíduo, sendo causada pela combinação entre as covariâncias genéticas e ambientais. A covariância genética é devida aos efeitos pleiotrópicos, em que alguns genes apresentam um efeito sobre um ou mais caracteres (FALCONER e MACKAY, 1996).

A seleção de um caráter pode conhecidamente ou desconhecidamente resultar em uma seleção contra ou a favor de um segundo caráter. Em alguns casos as correlações podem ser úteis, um exemplo é o trabalho de De Jong e Garretsen (1985) que estimaram uma correlação genética positiva e significativa para o número de hastes florais em gérbera (que requer um período de crescimento mais longo para avaliação) em relação ao número de brotos laterais (que pode ser avaliado no início do estágio). Este tipo de correlação está sob a filosofia de seleção indireta, ou seja, é baseado no melhoramento de um caráter complexo sobre a seleção de um caráter simples que pode ser determinado rapidamente ou que tem uma maior estimativa de herdabilidade no sentido amplo (LANGTON, 1991).

2.5 SELEÇÃO

Seleção é definida como a reprodução diferencial dos diferentes genótipos na natureza (seleção natural) ou aquela promovida pelo homem (seleção artificial). Ela atua promovendo a alteração de frequências alélicas nos locos que controlam o caráter sob seleção, modificando a média genotípica da população (RESENDE, 2002a).

A definição correta do objetivo da seleção é um requisito essencial para obtenção de sucesso nos programas de melhoramento genético. O objetivo da seleção ou do melhoramento pode ser definido como caráter econômico final, único ou um conjunto de caracteres agrupados, para os quais se deseja obter um dado ganho genético (PINTO JÚNIOR, 2004).

A seleção em plantas ornamentais pode ser realizada para um caráter ou para vários caracteres. Na seleção individual também chamada de seleção massal, as plantas são selecionadas com base em seus valores fenotípicos. Quando essa seleção é realizada ao longo de um período de gerações é chamada de seleção recorrente, e o sucesso dessa seleção ocorrerá de acordo com a variância genética aditiva da população (HARDING *et al.*, 1991). Na seleção para vários caracteres, o

mesmo autor cita o método *em tandem* que por várias gerações as progênies são selecionadas para somente um caráter, até que esse caráter esteja suficientemente melhorado. Outro método é o independente, em que o melhorista seleciona a cada geração um caráter alvo independentemente de outros caracteres. E por fim no método de seleção por índices, os vários caracteres irão gerar um “ranking” sobre o qual a seleção é realizada com valores paramétricos ou não paramétricos.

De acordo com Resende *et al.* (1995) o método ideal de seleção irá depender dos seguintes fatores: herdabilidade do caráter, objetivo da seleção, número de famílias e indivíduos avaliados por experimento, heterogeneidade ambiental na área do experimento. Outro fator de extrema importância é a acurácia de seleção, que depende fundamentalmente das fontes de informação utilizadas para a predição dos valores genéticos e da própria herdabilidade (RESENDE, 2002a).

Contudo, selecionar progênies superiores não é tarefa fácil, uma vez que os caracteres de importância, em sua maioria quantitativos, apresentam comportamento complexo, por serem influenciados pelo ambiente e estarem inter-relacionados, de tal forma que a seleção de um caráter provoca uma série de mudanças em outros caracteres (CRUZ, 2001). Para a obtenção de genótipos superiores, é necessária a reunião de uma série de atributos favoráveis que confirmem rendimento comparativamente mais elevado e satisfaçam as exigências do mercado (CRUZ e REGAZZI, 1997).

2.6 PROCEDIMENTO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA RESTRITA/MELHOR PREDIÇÃO LINEAR NÃO VICIADA (REML/BLUP)

Os valores genéticos são variáveis aleatórias não observáveis, preditas a partir dos valores fenotípicos observáveis, comumente usados nos programas de melhoramento de plantas. A sua predição, que pode ser feita de forma pontual ou intervalar, deve ser precisa e acurada, pois aumenta ganhos pretendidos, diminuindo as possibilidades de erro na seleção. A predição pontual fornece os valores genéticos, ao passo que a intervalar inclui os intervalos de confiança dos valores e dos ganhos genéticos, propiciando uma recomendação mais segura dos indivíduos envolvidos e, portanto, deve ser preferencial (RESENDE, 2002b).

Os valores genéticos preditos, entretanto, não são iguais aos valores genéticos verdadeiros dos indivíduos. Conforme Vleck *et al.* (1987), a proximidade

entre esses dois pode ser avaliada com base na estatística denominada acuidade (acurácia), a qual refere-se à correlação entre os valores genéticos preditos e verdadeiros dos indivíduos. A acuidade seletiva depende da herdabilidade e repetibilidade do caráter, da quantidade e qualidade das informações e dos procedimentos utilizados na predição dos valores genéticos. Como é uma medida associada à precisão na seleção, a acuidade é o principal elemento do progresso genético que pode ser alterado pelo homem, visando maximizar o ganho genético (RESENDE, 2002a). A acuidade é também importante na comparação de métodos de seleção, pois quanto maior o seu valor, melhor preditor do valor genético verdadeiro é o método de seleção.

A predição de valores genéticos exige a prévia estimação dos componentes de variância e de parâmetros genéticos. Dentre os procedimentos utilizados o BLUP (Melhor predição linear não viciada) é o mais completo e conduz à maximização do ganho genético, por ciclo de seleção (RESENDE 1997a; RESENDE, 1997b).

O método da Máxima Verossimilhança Restrita (REML) é, atualmente, o método padrão para a estimação dos componentes de variância, a partir de dados não balanceados em espécies perenes (PATTERSON e THOMPSON, 1971). Resende (2002b) fornece os estimadores para os componentes de variância associados aos modelos estatísticos para os delineamentos experimentais de blocos ao acaso, látice, linha e coluna, associadas aos vários delineamentos de cruzamentos (meios-irmãos, dialélicos e outros).

No melhoramento de plantas perenes, o uso de técnicas de avaliação genética com base em modelos mistos do tipo REML/BLUP (máxima verossimilhança restrita/melhor predição linear não viciada) é fundamental para a predição de valores genéticos aditivos e genotípicos de indivíduos com potencial para seleção, tanto em nível intrapopulacional como interpopulacional (RESENDE, 2000; RESENDE 2002b).

De acordo com Resende (2002a) as vantagens da utilização do REML/BLUP são: pode ser aplicado a dados desbalanceados; permite utilizar um grande número de informações, provenientes de diferentes gerações, locais e idades, gerando estimativas e predições mais precisas; não exige dados sob estruturas rígidas de experimentação, podendo ser aplicada a dados obtidos normalmente nos programas de melhoramento, os quais não precisam estar associados a delineamentos, bastando que se tenham informação sobre a genealogia dos indivíduos; permite a

estimação dos efeitos de dominância e epistáticos, além dos aditivos; permite o desenvolvimento de programas nacionais de avaliação genética, fato que permite elevar a taxa global de melhoramento da espécie; permite o ajuste de vários modelos alternativos, podendo-se escolher o que se ajusta melhor aos dados e, ao mesmo tempo, é parcimonioso (apresenta menor número de parâmetros); permite comparar indivíduos através do tempo e do espaço; permite lidar com estruturas complexas de dados (medidas repetidas, diferentes anos, locais e delineamentos); permite a simultânea correção para os efeitos ambientais, estimação de componentes de variância e predição de valores genéticos.

O procedimento REML/BLUP vem sendo aplicado com sucesso no melhoramento de espécies florestais (RESENDE *et al.*, 1996), cacau (RESENDE e DIAS, 2000), seringueira (COSTA *et al.*, 2000), pupunha (FARIAS NETO e RESENDE, 2001), acerola (PAIVA *et al.*, 2002) e cana-de-açúcar (BARBOSA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2007); para espécies ornamentais não foi encontrado nenhum trabalho.

2.7 ESTUDOS CITOGENÉTICOS

A citogenética fornece informações indispensáveis para a manipulação de plantas. Neste contexto, o número cromossômico é um dos parâmetros mais utilizados para a caracterização citológica de uma espécie, que aliados a outros caracteres citológicos fornecem informações para o entendimento das alterações genéticas envolvidas (SYBENGA, 1998).

Para o melhoramento das espécies ornamentais a classificação celular tem diferentes aplicações: fração de pólen com diferentes níveis de ploidia, detecção de gametas não reduzidos, detecção do produto da fusão de protoplastos, contagem de células viáveis e detecção de patógenos (EECKHAUT *et al.*, 2005).

A técnica de contagem de cromossomos convencional é a metodologia mais utilizada. Para poder realizar este estudo é necessário selecionar o tecido meristemático idôneo da espécie vegetal, e assim poder visualizar células em divisão mitótica, em geral, são utilizados ápices de raízes, folhas, calos obtidos *in vitro* entre outros (MARTIN, 2003).

2.7.1 Citogenética em Hemerocale

O número cromossômico varia de uma espécie à outra e geralmente se mantém constante em indivíduos de uma mesma espécie. Xiqués (2002) cita que a maioria dos organismos superiores é diplóide, com dois grupos de cromossomos homólogos: um dos grupos é doado pelo pai e o outro pela mãe. Porém, pode ocorrer polimorfismo cromossômico (número cromossômico desigual) por causas naturais, e estima-se que um terço das angiospermas possui mais de dois grupos de cromossomos (poliploidismo).

Para as espécies nativas de hemerocale a maioria é diplóide. Raras cultivares apresentam a característica triplóide que são geralmente estéreis. A conversão de numerosos cultivares diplóides para tetraplóides tem sido realizada via o uso de tratamento com colchicina. Isto tem resultado num aumento no tamanho das flores para além dos padrões exclusivos de distribuição da pigmentação das flores (TOMKINS *et al.*, 2001).

Em revisão do número cromossômico em 27 espécies de *Hemerocallis* e oito cultivares Zadoo *et al.* (1975), verificaram que, todos os cariótipos apresentaram $2n = 2x = 22$ cromossomos, apenas algumas variedades e clones apresentaram $2n = 23, 24, 32, 33$ e 34 cromossomos. Os mesmos autores mencionaram que $x = 11$ em hemerocale é uma exceção na família *Liliaceae* e acreditam que $x = 11$ derivou-se de um número menor, como 6 ou 5 e que esses cromossomos foram duplicados originando o número básico $x = 11$.

Vijayavalli e Mathew (1990) confirmaram que o número básico do gênero hemerocale é $x = 11$, e salientaram que os diferentes números encontrados foram devido ao uso de metodologias pouco eficientes.

Em trabalho sobre informações básicas de cariótipos de espécies da família *Liliaceae* realizado por Lovatto e Battistin (1997), consta que a espécie *Hemerocallis flava* é diplóide com $2n = 2x = 22$ e a espécie *Hemerocallis fulva* é uma triplóide com $2n = 3x = 33$.

2.8 MARCADORES MOLECULARES

Existem duas classes de marcadores genéticos: os morfológicos e os moleculares (TANKSLEY, 1983). Primeiramente, a identificação e a caracterização

tradicional das variedades tem se baseado no emprego de caracteres morfológicos e /ou agrônômicos. No entanto, os caracteres morfológicos têm muitos limitantes, pois sua expressão pode estar sujeita a fatores ambientais ou fenológicos.

Por outro lado, os avanços da biologia molecular têm desenvolvido métodos de identificação e caracterização no uso de marcadores moleculares que superam a maioria das limitações. Os marcadores moleculares são independentes do efeito do ambiente, apresentam maior segregação ou polimorfismo que os morfológicos, permitem a identificação correta de variedades sem a necessidade de muitos caracteres e estão livres dos efeitos epistáticos (TANKSLEY, 1983; THOMAS *et al.*, 1993; PHILLIPS *et al.*, 1995; RALLO *et al.*, 2002).

Os marcadores moleculares podem ser aplicados para diversos fins, como: estudar a estrutura genética de populações; realizar a análise de filogenias; detectar ligação gênica com caracteres mono e poligênicos; caracterizar variedades; avaliar germoplasma; realizar estudos de introgressão gênica; realizar seleção indireta de características agrônômicas, dentre outros. Pesquisas nesta área estão sendo desenvolvidas tendo-se alguns casos de eficiência comprovada, do emprego das técnicas de marcadores moleculares nos estudos de genética de populações, genética quantitativa e no melhoramento de plantas (SÁNCHEZ, 2002)

As técnicas de marcadores moleculares mais utilizadas, atualmente, são RFLP ("Restriction Fragment Length polymorphism"), RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism"), SSR - Microssatélites ("Simple Sequence Repeats") e SNP ("Single Nucleotide Polymorphism").

Para a escolha do marcador molecular mais apropriado devem ser considerados os objetivos da pesquisa em conjunto com a disponibilidade ou o acesso a tecnologia, bem como o custo para o desenvolvimento do marcador e o conteúdo de informações (MEEROW, 2005).

2.8.1 RAPD

O método RAPD foi descrito pela primeira vez em 1990 por dois grupos de pesquisadores independentes (WILLIAMS *et al.*, 1990; WELSH e MC CLELLAND, 1990). Esse método é baseado na amplificação do DNA genômico utilizando iniciadores ("primers") de sequência arbitrária (WELSH e MC CLELLAND, 1990).

Ferreira e Grattapaglia (1998) relatam que esse método é uma variação do protocolo de PCR, porém com duas características diferentes: a primeira é que utiliza um iniciador único, ao invés de um par de iniciadores; e a segunda é que este iniciador possui seqüência arbitrária, sendo desconhecida a seqüência alvo. Teoricamente o número de marcadores RAPD amplificados e visualizados na eletroforese depende exclusivamente do comprimento do iniciador utilizado e do tamanho e complexidade do genoma analisado. Uma característica fundamental dos marcadores RAPD é o fato deles se comportarem como marcadores genéticos dominantes, genótipos heterozigotos não podem ser diretamente discriminados dos homozigotos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Em lírios híbridos, por exemplo, a eficiência da reação de RAPD aumentou com o aumento do comprimento do iniciador, ou seja, o maior número de fragmentos amplificados em uma reação simples foi obtido com iniciadores de 15 e 20 bases quando comparado com iniciadores de 10 e 12 bases (YAMAGISHI *et al.*, 2002). Segundo os mesmos autores, o aumento do comprimento do iniciador aumenta a especificidade no anelamento entre iniciador e DNA molde.

Os marcadores RAPD apresentam algumas vantagens como simplicidade, rapidez e menor custo quando comparados com RFLP e AFLP (JIN *et al.*, 2008). Entretanto, apresentam algumas desvantagens, como o baixo conteúdo de informações genéticas por loco; a impossibilidade de discriminar genótipos heterozigotos de homozigotos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Em ornamentais, os marcadores RAPD são utilizados para o estudo da variabilidade genética. Esta técnica já foi utilizada na determinação da variabilidade genética de *Alstroemeria* sp. L. (ANASTASSOPOULOS e KEIL, 1996), *Dendrathera grandiflora* T. (WOLF e PETERS-VAN RIJN, 1993), *Rosa* sp (JAN *et al.* 1999) e *Viola* spp. (KO *et al.*, 1998).

Estudos de genéticas de associações também têm utilizado com frequência marcadores RAPD. Chung *et al.* (2001) utilizaram a técnica RAPD para caracterizar 24 cultivares de gérbera utilizando 80 iniciadores. Os autores constataram uma alta similaridade genética (média de 0,72), a qual permitiu o agrupamento das cultivares em cinco grupos.

Em *Hippeastrum*, o marcador RAPD foi utilizado para a caracterização de cultivares. A análise de dados de sete iniciadores permitiu o agrupamento das cultivares em dois grupos com coeficiente de similaridade genética de 0,7

(CHAKRABARTY *et al.*, 2007).

Estudo de caracterização genética também foi feito em espécies de *Limonium* por Bruna *et al.* (2004). Neste estudo, 13 espécies analisadas com 10 iniciadores obtiveram 244 bandas. O coeficiente de similaridade obtido foi de valores baixos (de 0,10 a 0,40) o que dificultou a identificação de ramos entre três espécies *L. caspia*, *L. bellidifolium* e *L. otolepis*, indicando que essas três espécies podem ser consideradas sinônimas.

Outros estudos utilizaram marcadores RAPD para a caracterização de híbridos. Yamagishi (1995) desenvolveu marcadores RAPD que foram usados para a caracterização e detecção de híbridos de espécies de *Lilium*. Em *Limonium*, *Prunus* e *Dianthus*, Benedetti *et al.* (2001) confirmaram a identidade genética e identificaram os marcadores associados à longevidade pós-colheita utilizando RAPD. Além disso, diferenciaram cultivares de *Rosa* e *Gerbera*.

A paternidade de híbridos interespecíficos também pode ser confirmada com marcadores RAPD (BENEDETTI *et al.*, 2000). Em *Alstroemeria* estes autores confirmaram parentais de quatro híbridos interespecíficos e verificaram o erro na citação dos parentais de um híbrido analisado.

Além desses trabalhos, o marcador RAPD vem sendo utilizado em estudos de detecção de cultivares resistentes à patógenos. Em *Gerbera* foi identificado marcadores associados à resistência ao patógeno *Fusarium* (DALLAVALLE *et al.*, 2002) e na análise de relação genética entre espécies de orquídeas (TAYWIYA *et al.*, 2008)

2.8.2 SSR

Microsatélites são seqüências de 1 a 6 nucleotídeos que se repetem lado a lado na fita de DNA, no genoma dos eucariotos (TAUTZ, 1989). Regiões contendo essas seqüências podem ser amplificadas por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando um par de iniciadores específicos (cerca de 20 – 25 bases) complementares a seqüências conservadas que flanqueiam o microsatélite. Essa técnica revela polimorfismo em um loco, devido a diferenças no número de vezes que o microsatélite (por exemplo, CA, AG, TTG, ATGC) repete-se naquele loco (TAUTZ, 1989; HANCOCK, 1995). Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco.

Quando comparado com outros marcadores moleculares, os ensaios com SSR são altamente polimórficos e informativos; a herança é co-dominante, o que permite a discriminação entre homozigotos e heterozigotos; são multialélicos, são baseados em PCR, e, portanto necessitam de pequena quantidade de DNA; são altamente reproduzíveis; não requerem radioatividade; estão bem dispersos no genoma, em regiões codificadoras e não-codificadoras, os locos são frequentemente conservados entre espécies relacionadas (MORGANTE e OLIVIERI, 1993; GUPTA *et al.*, 1996; POWELL *et al.*, 1996, JONES *et al.*, 1997; RUSSELL *et al.*, 1997; BUSO *et al.*, 2003; PRASAD *et al.*, 2000; VARSHNEY *et al.*, 2005).

Os SSR têm mostrado grande habilidade para determinar diferenças genéticas quando comparados a outras classes de marcadores genéticos (MUELLER e WOLFENBARGER, 1999; SUNNUCKS, 2000), devido a sua grande quantidade e distribuição no genoma associado à alta variabilidade, tornando-os capazes de gerar uma maior definição e resolução (SCHLOTTERER, 2000; BALLOUX e LUGON - MOULIN, 2002). Por estas razões, eles são rotineiramente usados para identificação *forensis* (OLAISEN *et al.*, 1997; MUKAIDA *et al.*, 2000), análises de “pedigree” (MC COUCH *et al.*, 1997), e determinação da estrutura da população (POWELL *et al.* 1996; GOLDSTEIN e SCHLOTTERER, 1999; SCHLOTTERER, 2000). Devido à natureza co-dominante estes marcadores podem ser usados em estudos de parentesco e de proteção e de identificação de variedades de plantas em bancos de germoplasma (DIWAN e CREGAN, 1997; LOPES *et al.*, 1999).

O grande poder de discriminação dos microssatélites justifica seu uso quando se pretende obter uma boa representação da diversidade genética existente, conduzindo a estudos de diversidade inter e intra-específicos e promovendo a compreensão do genoma (ARADHYA *et al.*, 2003). De acordo com Milach *et al.* (1998) SSR se tornou uma das melhores opções para uso na caracterização de cultivares, especialmente em germoplasma aparentado e de baixa variabilidade.

A principal desvantagem desses marcadores é o alto custo inicial que envolve o desenvolvimento de pares de iniciadores específicos, o qual é um processo elaborado e caro (MEEROW, 2005). Mas uma vez que os iniciadores estejam disponíveis, o custo da técnica assemelha-se a de RAPD, com exceção de que os géis para a visualização dos fragmentos de DNA devem ser de poliacrilamida e esses são de custo mais elevado. Uma vantagem para o par de iniciador específico

desenhado é que permite a PCR multiplex, a qual vários locos microssatélites podem ser analisados em uma mesma reação de amplificação (MEEROW, 2005).

Vários microssatélites foram isolados e caracterizados em diversas espécies de flores e plantas ornamentais, incluindo *Rhododendron matternichii* (NAITO *et al.*, 1998), *Iris* (BURKE *et al.*, 1999), *Pelargonium* (BECHER *et al.*, 2000), *Primula* (ISAGI *et al.*, 2001), *Begonia sutherlandii* (HUGHES *et al.*, 2002), *Lilium philadelphium* (HORNING *et al.*, 2003), *Rosa damascena* (BAYDAR *et al.*, 2004), *Hosta* (YAMAMOTO *et al.*, 2008).

Mitake e Yahara (2006) publicaram os primeiros pares de marcadores SSR para o *Hemerocallis* a partir de uma biblioteca genômica enriquecida. Foram obtidos 20 marcadores SSR, com média de heterozigosidade de 0,35 a 0,85 para *H. fulva* e de 0 a 0,95 para *H. citrina*.

2.8.2.1 Reações Múltiplas de Microssatélites (Multiplex)

PCR múltiplo ou multiplex é uma variante da PCR na qual dois ou mais locos são simultaneamente amplificados na mesma reação ou, ainda, amplificados em reações distintas, mas genotipados simultaneamente. O desenvolvimento de um sistema multiplex requer: 1) a seleção de marcadores moleculares de acordo com a variação de tamanho dos alelos de cada loco, evitando sobreposição de faixas de alelos em marcadores marcados com o mesmo fluorocromo; 2) PCR de cada marcador molecular sob as mesmas condições de amplificação; 3) PCR múltiplo numa mistura equimolar dos “primers”; 4) ajuste do tempo e da temperatura de extensão; 5) ajuste do tempo e temperatura de anelamento; 6) ajuste da quantidade de marcadores em multiplex; e 7) ajuste da concentração do tampão da enzima. Esta técnica tem permitido a ampliação simultânea de vários locos na mesma reação e tornou-se um meio rápido e conveniente para a genotipagem em larga escala (HENEGARIU *et al.*, 1997).

O sistema automatizado de determinação do tamanho dos alelos SSR marcados com fluorescência é um sistema em que um dos “primers” PCR para um loco SSR (geralmente o “primer forward”) é marcado com um marcador fluorescente colorido. Os produtos da PCR carregando diferentes marcadores fluorescentes são separados em eletroforese capilar. O uso de microssatélites marcados com fluorescência para a genotipagem automática em seqüenciadores de DNA oferece

muitas vantagens em relação à análise usando técnicas de eletroforese coradas com prata. Uma das vantagens é o significativo aumento na acurácia na mensuração do tamanho do alelo, obtido pelo uso de um padrão interno em cada coluna de gel e analisado com o uso de algoritmo automatizado (“allele calling”). De um modo geral, a automatização aumenta a velocidade e a acurácia da coleta de dados e o processamento da informação. A alta sensibilidade da detecção também reduz o volume necessário (e, sobretudo, o custo) da reação de PCR e permite a detecção dos locos que apresentam amplificação mais difícil, além de eliminar o uso de radioatividade (MITCHELL *et al.*, 1997; COBURN *et al.*, 2002).

A capacidade de montar uma PCR com vários pares de “primers” em uma única reação é necessária para reduzir o tempo, trabalho e custo da genotipagem (OLIVO, *et al.*, 2000). A montagem de painéis de genotipagem multiloco semi-automatizada impõe que microssatélites marcados com a mesma fluorescência possuam variação de tamanho de alelos diferentes e aqueles com faixa de tamanho em sobreposição sejam marcadores com fluorescência diferente (ZIEGLE *et al.*, 1992). A mistura dos microssatélites pode ser feita após a reação de amplificação, ou os locos microssatélites podem ser amplificados juntos numa mesma reação de PCR (MITCHELL *et al.*, 1997).

Em *Hemerocallis* não há trabalhos reportando o uso de painéis de reações múltiplas. No entanto para outras espécies, essa metodologia vem sendo utilizada como por exemplo em *Vitis vinifera* L., na qual seis marcadores microssatélites foram organizados em dois painéis para a caracterização de 12 variedades (PINTO-CARNIDE *et al.*, 2003). Outro exemplo é o trabalho realizado por Schuck (2007), o qual organizou 10 marcadores microssatélites em cinco painéis para caracterizar molecularmente variedades de *Vitis* spp. Para arroz foram desenvolvidos painéis de 16 locos (PESSOA FILHO *et al.*, 2004)

O uso da análise de fragmentos de restrição automática baseada na fluorescência foi primeiro reportado por Carrano *et al.* (1989). Este método foi adaptado e melhorado para a análise com microssatélites (EDWARDS *et al.*, 1991; ZIEGEL *et al.*, 1992). Os métodos automáticos de genotipagem com SSR estão gradualmente substituindo os sistemas manuais de genotipagem no melhoramento de plantas e na pesquisa genética.

2.9 REFERÊNCIAS

- ALLARD, R. W. **Princípios do Melhoramento Genético de Plantas**. São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda, 1971, 381 p.
- ANASTASSOPOULOS, E.; KEIL, M. Assessment of natural and induced genetic variation in *Alstroemeria* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Euphytica**, v. 90, p. 235-244, 1996.
- ARADHYA, M. K.; DANGL, G. S.; PRINS, B. H.; BOURSQUOT, J. M.; WALKER, M. A.; MEREDITH, C. P.; SIMON, C. J. Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. **Genetical Research**, v. 81, n. 3, p. 179-192, 2003.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOLIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellites markers. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 2, p. 155-165, 2002.
- BARBOSA, M. H. P.; RESENDE, M. D. V.; BRESSIANI, J. A.; SILVEIRA, L. C. I. da.; PETERNELLI, L. A. Selection of sugarcane families and parents by Reml/Blup. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, p. 443-450, 2005.
- BAYDAR, N. G.; BAYDAR, H.; DEBENER, T. Analysis of genetic relationships among *Rosa damascena* plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers. **Journal of Biotechnology**, v. 111, p. 263-267, 2004.
- BECHER, S. A.; STEINMETZ, K.; WEISING, K.; BOURY, S.; PELTIER, D.; RENOU, J.P.; KAHL, G.; WOLFF, K. Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 643-651, 2000.
- BENEDETTI, L. de.; BURCHI, G.; MERCURI, A.; PECCHIONI, N.; FACCIOLO, P.; SCHIVA, T. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for the verification of hybridity in interspecific crosses of *Alstroemeria*. **Plant Breeding**, v. 119, p. 443-445, 2000.
- BENEDETTI, L.; MERCURI, A.; BRUNA, S.; BURCHI, G.; SCHIVA, T. Genotype identification of ornamental species by RAPD analysis. **Acta Horticulture**, v. 546, p. 391-394, 2001.
- BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: UFV, 1997, 547 p.
- BOREM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 4 ed. Viçosa: UFV, 2005.

525p.

BOTANY. Disponível em: <<http://www.botany.com>> Acesso em 15 de out. de 2004.

BRUNA, S.; BENEDETTI, L. de.; MERCURI, A.; SCHIVA, T.; BURCHI, G.; PECCHIONI, N.; AGRIMONTI, C. Use of RAPD for the genetic characterization of *Limonium* species. **Acta Horticulture**, v. 651, p. 155-160, 2004.

BURKE, J. M.; ARNOLD, M. L. L. Isolation and characterization of microsatellites in iris. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1075-1092, 1999.

BUSO, G. S. C. O.; CIAMPI, A. Y.; MORETZOHN, M. de C.; AMARAL, Z. P. de S. **Protocolo para desenvolvimento de microsatélites**. Circular Técnica, n. 20, Brasília, DF, 2003.

CALLAWAY, M. B.; CALLAWAY, D. J. Genetics and its applications. In: CALLAWAY, D. J.; CALLAWAY, M. B. (Ed.). **Breeding Ornamental Plants**. Portland, Oregon: Timber Press, p. 19 – 37, 2000.

CARRANO, A. V.; LAMERDIN, J.; ASHWORTH, L. K.; WATKINS, B.; BRANSCOMB, E.; SLEZAK, T.; RAFF, M.; DE JONG, P. J.; KEITH, D.; MCBRIDE, L.; MEISTER, S.; KRONICK, M. A high resolution, fluorescence-based, semiautomated method for DNA fingerprinting. **Genomics**, v. 4, p. 129–136, 1989.

CHAKRABARTY, D.; GUPTA, V. N.; DATTA, S. K. Varietal identification and assessment of genetic relationships in *Hippeastrum* using RAPD markers. **Plant Biotechnology**, n. 1, p. 211-217, 2007.

CHUNG, Y.; KIM, H.; KIM, K.; PARK, S.; YI, Y.; LEE, J.; KWON, O. Morphological characteristics and genetic variation of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort). **Journal of Plant Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 145-149, 2001.

COBURN J. R., TEMNYKH S. V., PAUL E. M., MCCOUCH, S. R. Design and panels for semiautomated genotyping of rice (*Oryza sativa* L.). **Crop Science**, v. 42, p. 2092-2099, 2002.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e Exóticas Cultivadas**, Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, v.3, 1952. 120p.

COSTA, P.; POT, D.; DUBOS, C.; FRIGERIO, J. M.; PIONNEAU, C.; BODENES, C.; BERTOCCHI, E.; CERVERA, M. T.; REMINGTON, D. I.; PLOMION, C. A genetic

map of *Maritime pine* based on AFLP, RAPD and protein markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 39-48, 2000.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: versão Windows, aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: Editora, UFV, 2001. 648p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora, UFV, 1997. 390p.

DALLAVALLE, E.; D'AULERIO, A. Z.; VERARDI, E.; BERTACCINI, A. Detection of RAPD Polymorphisms in *Gladiolus* Cultivars with differing sensitivities to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Gladioli*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 20, p. 305a–305f, 2002.

DE JONG, J. Selection for Physiological Traits. In: HARDING, J.; SINGH, F.; MOL, J. N. M. (eds.). **Genetics and Breeding of Ornamental Species**. Boston: Kluwer Academic Publisher, p. 110-131, 1991.

DE JONG, J.; GARRETSEN, F. Genetic analysis of flower and lateral shoot production in gerbera. **Euphytica**, v. 34, p. 785-791, 1985.

DIWAN, N.; CREGAN, P. B. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 723–733. 1997.

DUDLEY, J. W.; MOLL, R. H. Interpretation and use of estimation of heritability and genetic variances in plant breeding. **Crop Science**, v. 2, n. 3, p. 257-262, 1969.

EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H. A. AND CASKEY, C. T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Human Genetics**, v. 49, p. 746–756. 1991.

EECKHAUT, R.; LEUS, L.; HUYLENBROECK, J. V. Exploitation of flow cytometry for plant breeding. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 4B, p. 743-750, 2005.

ERHARDT, W. **Hemerocallis Daylilies**. Portland, Oregon: Timber Press, 1992, 160p.

FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Trad. de Martinho de Almeida e Silva e José Carlos Silva. Viçosa, UFV. Impr. Univ., 1987. 279p.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4th ed. Longman: Harlow, 1996. 464 p.

FARIAS NETO, J. T.; RESENDE, M. D. V. de. Aplicação da metodologia de modelos mistos (REML/BLUP) na estimação de componentes de variância e predição de valores genéticos em pupunheira (*Bactris gasipaes* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 320-324, 2001.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

GATLIN, F. L. **An illustrated Guide to Daylilies**. USA: American Hemerocallis Society, 1999. 100p.

GATLIN, F. L.; BRENNAN, J. R. **The New Daylily Handbook**, 2 ed. USA: American Hemerocallis Society INC, 2002. 320p.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLOTTERER, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, New York, 1999.

GROSVENOR, G. **Daylilies for the Garden**. Portland, Oregon: Timber Press Inc. 1999. 176 p.

GUPTA, P. K.; BALYAN, H. S.; SHARMA, P. C.; RAMESH, B. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. **Current Science**, v. 70, n. 1, p. 45-54, 1996.

HANCOCK, J. M. The contribution of slippage-like processes to genome evolution. **Journal of Molecular Evolution**, v.41, p. 1038-1047, 1995.

HARDING, J.; BYRNE, T.; HUANG, H.; YU, Y. Multi-trait selection in flower crops. In: HARDING, J.; SINGH, F.; MOL, J. N. M. (eds.). **Genetics and Breeding of Ornamental Species**. Boston: Kluwer Academic Publisher, p. 158-177, 1991.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N. A.; DLOUHY, S. R.; VANCE, G. H.; VOGT, P. H. Multiplex PCR Critical Parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**, v. 23, p. 504–511, 1997.

HU, S. Y. An Early History of Daylily. **American Horticultural Magazine**, v.47, p. 51-85, 1968.

HUGHES, M.; HOLLINGSWORTH, P. M.; SQUIRRELL, J. Isolation of polymorphic microsatellite markers for *Begonia sutherlandii* Hook, f. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 185-186, 2002.

ISAGI, Y.; HONJO, M.; WASHITANI, I. Development of microsatellite markers for *Primula sieboldii* using degenerate oligonucleotide-primed PCR-amplified DNA. **Molecular Ecology**, v. 1, p. 22-24, 2001.

JAN, C. H.; BYRNE, D. H.; MANHART, J.; WILSON, H. Rose germplasm analysis with RAPD markers. **Hort Science**, v.34, n. 2, p.341-345, 1999.

JIN, S.; MUSHKE, R.; ZHU, H.; TU, L.; LIN, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, X. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 1303-1316, 2008.

JONES, C. J.; EDWARDS, K. J.; CASTAGLIONE, S.; WINDIELD, M. O.; SALA, F.; WIEL, C.; VAN DE BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATHES, M.; DALY, A.; BRETTSCHEIDER, R.; BETTINI, P.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSKI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VASQUEZ, A.; KARP, A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 381-390, 1997.

KO, M. K.; YANG, Y. H.; LEE, C. H.; OH, B. J. Genetic relationship of *Viola* species evaluated by random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.73, n.5, p.601-605, 1998.

KRIKORIAN, A. D.; STAICU, S. A.; KANN, R. P. Karyotype analysis of a daylily clone reared from aseptically cultured tissues. **Annals of Botany**, v. 47, p. 121-131, 1981.

KROURY, N.; WHITE, J. W. Juvenility and response time of kalanchoe cultivars. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 105, p. 724-726, 1980.

LANGTON, F. A. Selection for production traits in flower crops. In: HARDING, J.; SINGH, F.; MOL, J. N. M. (Ed). **Genetics and Breeding of Ornamental Species**. Boston: Kluwer Academic Publisher, p. 136-153, 1991.

LOPES, M. S.; SEFC, K. M.; DIAS, E. D.; STEINKELLNER, H.; LAIMER, M.; DA CAMARA MACHADO, A. The use of microsatellites for germplasm management in a

Portuguese grapevine collection. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, n. 3-4, p.733-739. 1999.

LOVATTO, M. T.; BATTISTIN, A. Citogenética em cinco espécies ornamentais de liliales. **Ciência Rural**, v. 27, n. 4, p. 583-587, 1997.

MARTIN, X. X. Caracterización citogenética de la variabilidade en plantas. In: **Marcadores moleculares nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas**, p. 67-91, 2003.

MC COUCH, S. R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y. G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, v. 35, p. 89-99, 1997.

MEEROW, A. W. Molecular genetic characterization of new floricultural germplasm. **Acta Horticulturae**, ISHS, v. 683, p. 43-63, 2005.

MILACH, S. C. K. **Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares**. Borém, Giudice, Sakiyama, Sedyama, Moreira, Portugal (eds.). Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária. Viçosa, 1998. 182p. Disponível *online* em <http://www.embrapa.br>. Acessado em 24/05/08.

MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; JESTER, C. A.; HERNANDEZ, C. J.; SZEWCMMCFADDEN, A. K. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semiautomated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. **Crop Science**, v. 37, p. 617-624, 1997.

MIYAKE, T.; YAHARA, T. Isolation of polymorphic microsatellite loci in *Hemerocallis fulva* and *Hemerocallis citrine* (Hemerocallidaceae). **Molecular Ecology**, v. 6, p. 909-9011, 2006.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v. 3, p. 175-182, 1993.

MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree**, v. 14, p. 389-394, 1999.

MUKAIDA, M.; KIMURA, H.; TAKADA, Y.; MASUDA, T.; NAKATA, Y. The personal identification of many samples recovered from under the sea. **Forensic Science International**, v. 113, p. 79–85, 2000.

MUNSON, R. W. J. **Hemerocallis – The Daylily**. Portland, Oregon: Timber Press, 1989. 144 p.

NAITO, K.; ISAGI, I.; NAKAGOSHI, N. Isolation and characterization of microsatellites of *Rhododendron matternichii* Sieb. Et Zucc. Var *hondoense* Nakai. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 927-928, 1998.

NAU, J. **Ball perennial manual: propagation and production**. Batavia, Illinois: Ball Publishing. p. 254-258, 1995.

O'BRIEN, I. E. W.; SMITH, D. R.; GARDNER, R. C.; MURRAY, B. G. Flow cytometric determination of genome size evaluation in coffee tree. **Plant Science**, v. 115, n. 1, p. 91-99, 1996.

OLAISEN, B.; STENERSEN, M.; MEVAG, B. Identification by DNA analysis of the victims of the August 1996 Spitsbergen civil aircraft disaster. **Nature Genetics**, v. 15, p. 402– 405. 1997.

OLIVEIRA, R. de O.; RESENDE, M. D. V. de.; DAROS, E.; BESPALHOK FILHO, J.C.; ZAMBON, J. L. C.; IDO, O. T.; WEBER, H.; KOEHLER, H. S. Genotypic evaluation and selection of sugarcane clones in three environments in the state of Paraná. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, p. 426-434, 2005.

OLIVEIRA, R de O. **Seleção de famílias de maturação precoce em cana-de-açúcar via REML/BLUP**. Curitiba : 2007. 127p. Tese (Doutorado em Agronomia, Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná.

OLIVO, C.; BARRAGÁN, M. C.; CASTELLAANOS, C.; RODRÍGUEZ, M. C.; SILIÓ & TORO, M. A. **Application of molecular markers (RAPD, AFLP and Microsatellites) to Iberian pig genotype characterization**. Departamento de Mejora Genética y biotecnología, INIA, Ctra. Coruna. Spain. 2000.

PAIVA, J. R. de; RESENDE, M. D. V. de; CORDEIRO, E. R. Índice multiefeitos (BLUP) e estimativas de parâmetros genéticos aplicados ao melhoramento da acerola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 799 – 807, 2002.

PATTERSON, H. D.; THOMPSON, R. Recovery of inter-block information when block sizes are unequal. **Biometrika**, v.58. p. 545-554, 1971.

PETIT, T. L.; CALLAWAY, D. J. Breeding Daylilies (*Hemerocallis hybrida*). In: CALLAWAY, D. J.; CALLAWAY, M. B. (Ed.). **Breeding Ornamental Plants**. Portland, Oregon: Timber Press, p. 19 – 37, 2000.

PETIT, T. L.; PEAT, J. P. **The Color Encyclopedia of Daylilies**. Portland, Oregon: Timber Press, 2000. 300p.

PINTO-CARNIDE, O.; MARTIN J. P.; LEAL, F.; CASTRO, I.; GUEDES-PINTO, H.; ORTIZ, J. M. Characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars from northern Portugal using RAPD and microsatellite markers. **Vitis**, v. 42, n. 1, p. 23–25, 2003.

PINTO-JÚNIOR, E. J. **REML/BLUP para análise de múltiplos experimentos no melhoramento genético de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden**. Curitiba : 2004. 113p. Tese (Doutorado em Agronomia, Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná.

PHILLIPS, W.; RODRÍGUEZ, H.; FRITZ, P. **Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*)**. Serie técnica. Informe técnico: n. 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1995. 183 p.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 215–222, 1996.

PRASAD, M.; VARSHNEY, R. K.; ROY, J. K.; BALYAN, H. S. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 584-592, 2000.

RALLO, P.; BELAJ, A.; DE LA ROSA, R.; TRUJILLO, I. **Marcadores moleculares (en línea)**. Córdoba, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en <http://www.extremadura21.com>

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; ZIMMERMANN, M. J de O. **Genética Quantitativa em Plantas Autógamas**. Goiânia: Editora da UFG, 1993. 271 p.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos e PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 3 ed. Ver. Lavras: UFLA, 2004. 472 p.

RESENDE, M. D. V. de; ARAUJO, A. J. de; SAMPAIO, P. T. B.; WIECHETECK, M. S. S. Acurácia seletiva, intervalos de confiança e variância de ganhos genéticos associados a 22 métodos de seleção em *Pinus caribaea* var. *Hondurensis*. **Revista Floresta**, v.24, n. 1/2, p. 35-45, 1995.

RESENDE, M. D. V. de; PRATES, D. F.; JESUS, A.; YAMADA, C. K. Estimação de componentes de variância e predição de valores genéticos pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) e melhor predição linear não viciada (BLUP) em *Pinus*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 32/33, p. 18-45, jan./dez. 1996.

RESENDE, M. D. V. de. Avanços da biométrica florestal. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 1997, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", p. 20-46, 1997a.

RESENDE, M. D. V. de. **Melhoramento genético de essências florestais**. In: SANTOS, J. B. SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS. Universidade Federal de Lavras, p. 59-93, 1997b.

RESENDE, M. D. V. de. **Análise estatística de modelos mistos via REML/BLUP na experimentação em melhoramento de plantas perenes**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 101 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 47).

RESENDE, M. D. V. de; DIAS, L. A. S. Aplicação da metodologia de modelos mistos (REML/BLUP) na estimação de parâmetros genéticos e predição de valores genéticos em espécies frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n. 1, p. 44-52, 2000.

RESENDE, M. D. V. **Genética Biométrica e Estatística no Melhoramento de Plantas Perenes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002a. 975p.

RESENDE, M. D. V. **Software SELEGEN – REML/BLUP**. Colombo: Embrapa Florestas, 2002b. 67p. (Embrapa Florestas. Documentos, 77).

ROOD, T. Daylily hybridizing for everyone: part 3. **Daylily Journal**, v. 57, n. 3, p. 293 – 297, 2002.

RUSSELL, J.; FULLER, J.; YOUNG, G.; THOMAS, B.; TARAMINO, G. MACAULAY, M.; WAUGH, R. and POWELL, W. Direct comparison of levels of genetic variation among barely accessions detected by RFLPs, AFLPs, SRRs and RAPDs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 45, p. 714-722. 1997.

SÁNCHEZ, I. Búsqueda y aislamiento de marcadores moleculares en *Pleurotus ostreatus* (en línea). Nava-rra, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible em www.unavarra.es/genmic/publicaciones/tfc/isabel-%

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromossoma**, v. 109, p. 365-371. 2000.

SCHUCK, M. R. **Caracterização molecular de variedades de videira (*Vitis spp*) de Santa Catarina por marcadores microssatélites (SSRs)**. Florianópolis : 2007. 149p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina.

SHEPHERD, R. K. **General genetics and inheritance**. In: INTERNAL TRAINING COURSE IN FOREST TREE BREEDING, 1977, Canberra: Australian Development Assistance Agency. p. 43-59, 1977.

SPARNAAIJ, L. D.; DEMMINK, J. F.; KOEHORST-VAN, PUTTEN, H. J. J. Variation between genotypes of carnation (*Dianthus caryophyllus* cultivars and interespecific hybrids) in time of flowering and response to long days. I. Variation in yield distribution. **Euphytica**, v. 50, p. 35-42, 1990.

STOUT, A. B.; CHANDLER, C. Pollen-tube behavior in *Hemerocallis* with special reference to incompatibilities. **Bulletin of the Torrey Club**, v. 60, p. 397-417, 1933.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree**, v.15, p. 199–203. 2000.

SYBENGA, J. Forty yeats of cytogenetics in plant breeding a personal view. In: **Topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Viena: T. Lelley; Universitäts Verlag, p.22-33, 1998.

TANKSLEY, S. Molecular markers in plant breeding. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, p. 3-8, 1983.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TAYWIYA, P.; BUNDITHYA, W.; POTAPOHN, N. Analysis of genetic relationship of the genus *Phalaenopsis* by RAPD technique. **Acta Horticulture**, v. 788, p. 39-45, 2008.

THOMAS, M. R., SATSUMOTO, S., CAIN, P., SCOTT, N. S. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, p. 173–180, 1993.

TOMBOLATO, A. F. C. Hemerocale – *Hemerocallis hybrida*. In: **Cultivo Comercial de Plantas Ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 176-211, 2004.

TOMKINS, J. P. DNA Fingerprinting in Daylilies. **The Daylily Journal American Hemerocallis Society**, v. 56, n. 2, p.195 – 200, 2001.

VÉGIS, A. Dormancy in Higher Plants. **Annual Review of Plant Physiology**. v. 15, p. 184-224, 1964.

VARSHNEY, R. K.; SIGMUND, R.; BORNER, A.; KORZUN, V.; STEIN, N.; SORRELLS, M. E.; LAN GRIDGE, P.; GRANER, A. Interespecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. **Plant Science**, v. 168, p. 195-202, 2005.

VIJAYAVALLI, B.; MATHEW, P.M. **Cytotaxonomy of the Liliaceae and allied families**. India: Continetal Publications, 1990. 187p.

VLECK, L. D. VAN.; POLLAK, E. J.; OLTENACU, E. A. B. **Genetics for the Animal Sciences**. New York: W. H. Freeman, 1987. 391 p.

XIQUES, X. Caracterización citogenética de la variabilidad en plantas. In: CORNIDE, M.T., ARENCIBIA, A., BEROVIDES, V., CALVO, D., CANALES, E., COTO, O., GONZÁLEZ, C., RODRÍGUEZ, M., SÁNCHEZ, J. E., SIGARRO, A., XIKUÉS, X. **Marcadores Moleculares, nuevos horizontes en la genética y la selección de plantas**. Ed. Felix Varela, La Habana, p 67-90, 2002.

YAMAGISHI, M. Detection of section-specific random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Lilium*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, p. 830-835, 1995.

YAMAGISHI, M.; ABE, H.; NAKANO, M.; NAKATSUKA, A. PCR-based molecular markers in Asiatic hybrid lily. **Scientia Horticulturae**, v. 96, p.225-234, 2002.

YAMAMOTO, H.; YAMADA, T.; MAKI, M. Isolation and characterization of microsatellite markers from the hosta species *Hosta albomarginata* (Liliaceae). **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 185-187. 2008.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6231-6235, 1990.

WILLIAMS, E. R.; MATHESON, A. C. **Experimental design and analysis for use in tree improvement**. Melbourne: CSIRO, 1995. 174 p.

WOLFF, K.; PETERS-VAN RIJN, J. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. **Heredity**, v. 71, p. 335-341, 1993.

ZADOO, S. N.; ROY, R. P.; KHOSHOO, T. N. Variation in karyotype in *Hemerocallis*. **La Cellule**, v. 71, p. 253-271, 1975.

ZIEGLE, J. S.; SU, Y.; CORCORAN, K. P.; NIE, L.; MAYRAND, P. E.; HOFF, L. B.; MCBIDE, L. J.; KRONICK, M. N.; DIEHL, S. R. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. **Genomics**, v. 14, p. 1026-1031. 1992.

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York, J. Wiley, 1984. 505 p.

3 CAPÍTULO I

PARÂMETROS GENÉTICOS, CORRELAÇÕES GENÉTICAS E SELEÇÃO DE FAMÍLIAS EM POPULAÇÃO DE HEMEROCALE VIA REML/BLUP

RESUMO

O mercado consumidor de *Hemerocallis X hybrida* Hort., hemerocale, demanda cultivares de porte médio a baixo e que produzam grande número de flores. O melhoramento para esses caracteres não tem apresentado grande eficiência devido ao pouco conhecimento sobre a sua herança. Considerando a necessidade de aumentar a eficiência na obtenção de cultivares de hemerocale com caracteres que o mercado vem exigindo, o presente trabalho teve como objetivo estimar parâmetros genéticos, bem como as correlações entre os caracteres quantitativos, e selecionar famílias com valores genotípicos superiores. Para esse estudo, treze cultivares americanas foram selecionadas em relação ao porte da planta e ao número de botões florais por haste. Após a seleção foram realizadas autofecundações e cruzamentos recíprocos. Dos cruzamentos efetuados nem todas as plantas produziram frutos, ou quando isto ocorria, em alguns não havia produção de sementes. Um total de 24 famílias foi obtido. Além disso, durante o primeiro e segundo ano, houve desuniformidade no florescimento das famílias obtidas sendo necessário avaliarem os caracteres: altura de plantas, comprimento e largura de folhas, número de hastes, número de botões florais por haste e número de botões florais por planta no terceiro ano. Dos resultados obtidos pode-se concluir que as estimativas de herdabilidade da média da família apresentaram-se superiores quando comparadas às estimativas de herdabilidade no sentido restrito individual para todos os caracteres avaliados. Foram obtidas estimativas de herdabilidade de magnitude mediana a alta para os caracteres altura de planta (0,89), comprimento da folha (0,83), largura da folha (0,69), número de hastes (0,68) e número de botões florais por planta (0,67), e de magnitude nula para número de botões florais por haste (0,006). As correlações genéticas observadas indicam que pode ser efetuada seleção para os caracteres altura de planta e número de hastes visando o aumento no número de botões florais por planta. Como houve uma variação entre os resultados obtidos para valores genotípicos, uma alternativa de seleção seria a combinação de caracteres que estejam correlacionados. Sendo assim, poderia indicar as famílias DL 2, DL 3, DL 5, DL 14, DL 15, DL 24 e DL 25, possibilitando a maior probabilidade de ganho genético em relação ao porte da planta e número de botões florais por planta. A seleção de famílias possibilitou um ganho genético de 19,80 % para altura de planta, 32,48% para número de hastes e 38,64% para número de botões florais por planta. As famílias selecionadas podem ser clonadas ou utilizadas para futuros cruzamentos para a geração de clones superiores.

Palavras-chave: planta ornamental, melhoramento de plantas, *Hemerocallis X hybrida* Hort., modelos mistos.

GENETIC PARAMETERS, GENETIC CORRELATION AND SELECTION OF FAMILIES IN DAYLILIES'S POPULATION USING REML/BLUP

ABSTRACT

The market of *Hemerocallis x hybrida* (Hort.), daylily, demands cultivars of medium height and that produce high number of flowers. The breeding for these characters does not because little is known about heritage in daylilies. Considering the necessity to increase efficiency in obtaining cultivars with characters that the market demands, this study aimed to predict heritability and genetic correlation by REML/BLUP (restricted maximum likelihood/best linear unbiased prediction) and to select families with high genotype values. Thirteen American daylily cultivars were selected for plant height and number of floral buds per stem. After selection, crosses were performed consisting of self- and cross- pollinations. A total of 24 families were obtained. Some crosses did not produce fruits, and some crosses did not produce seeds. Furthermore, there was no uniformity of flowering among families obtained. It was necessary to evaluate the following characteristics in the third year: plant height, length and width of leaves, stem number, number of floral buds per stem and number of floral buds per plant. Our results indicate that estimate of average heritability of families were superior than estimate of restrict individual heritability for all characters evaluated. High heritability estimate were obtained for plant height (0.89), leaf length (0.83), leaf width (0.69), stem number (0.68) and number of floral buds per plant (0.67). However a nule value for number of floral bud per stem (0.006). Genetic correlations observed indicated that selection for plant height and stem number aiming the increase of number of floral buds per plant. There was variation between the results for genotype values. An alternative selection would be a combination of characters that are correlated.. Thus, it could indicate families DL 2, DL 3, DL 5, DL 14, DL 15, DL 24 e DL 25. These families probability enabling the highest of genetic gain in relation of plant height and number of floral buds per plant. It was possible to select families that present genetic gain of 19.80% for plant height, 32.48% for stem number and 38,64% for number of floral buds per plant. The selected families may be cloned or used for crosses to produce superior clones.

Key-words: ornamental plant, breeding, *Hemerocallis x hybrida* Hort., mixed models.

3.1 INTRODUÇÃO

Hemerocallis X hybrida Hort., também conhecida como lírio-de-são-josé ou hemerocale é uma espécie ornamental que vem apresentando grande destaque entre as plantas utilizadas para jardim, sendo o maior interesse econômico para uso como forração, podendo ser cultivada em bordaduras ou em grupos formando maciços (LORENZI e SOUZA, 2001; TOMBOLATO, 2004).

Todos os anos, novas cultivares de hemerocales são lançadas no mercado nacional. Em parte, essas novas cultivares foram obtidas por meio de hibridizações entre cultivares introduzidas dos Estados Unidos e selecionadas para as condições locais (TOMBOLATO, 2001). As principais metas destas hibridizações têm sido a obtenção de plantas de porte mediano, com um maior número de flores por haste, e flores de cores diferenciadas. Dário Bergmann (2004)¹ melhorista de hemerocale, lançou mais de 60 cultivares e revelou que os cruzamentos que têm realizado tem apresentado uma baixa eficiência na obtenção de cultivares com esses caracteres. De acordo com Tombolato (2001), para atingir tais objetivos, é necessário o conhecimento da herança genética dos caracteres de seleção e das associações entre esses caracteres.

Reforçando tal evidência Tomkins *et al.* (2001) citam que apesar dos vários anos de hibridizações realizados em hemerocale, ainda persiste uma carência de informações sobre diversos aspectos e estudos sobre estimativas de parâmetros genéticos dessa espécie, tais como: o número de genes que governam o caráter, as ações e os feitos gênicos, herdabilidade, repetibilidade e associações genéticas com outros caracteres (RESENDE, 2002a).

A herdabilidade (h^2) é uma medida de proporcionalidade da variação total à natureza genética. Pode ser estimada no sentido amplo pela proporção da variância genética total em relação à variância fenotípica, ou no sentido restrito, determinada pelo quociente entre variância genética aditiva e a variância fenotípica (RESENDE, 2002a). Esse parâmetro genético subsidia a escolha da melhor estratégia de melhoramento a ser adotada (ALLARD, 1971; ZOBEL e TALBERT, 1984; FALCONER, 1987), mostra claramente o potencial de progresso genético esperado no programa de melhoramento e é essencial à predição de valores genéticos

¹ BERGMANN, D. Empresa Catarinense Agrícola da Ilha, Joinville, SC. Comunicação pessoal, 20 de novembro de 2004.

(RESENDE, 2002a).

Em *Heliconia psittacorum* elevadas estimativas de herdabilidade foram verificadas para números de dias para emissão de inflorescência (0,97), número de folhas (0,84), massa da haste (0,82), comprimento da haste (0,85) e das inflorescências (0,84), indicando maior possibilidade de sucesso no melhoramento genético de helicônia, mediante a seleção desses caracteres (COSTA *et al.*, 2007).

Outro parâmetro genético essencial para o melhoramento é a correlação seja ela genética ou fenotípica. A correlação genética entre caracteres indica o grau de associação destes caracteres (RESENDE, 2002b). Como em geral, em um programa de melhoramento objetiva-se selecionar os genótipos não para caracteres isolados, mas para um conjunto de caracteres simultaneamente, o estudo das correlações é de grande importância, pois permite quantificar a magnitude e direção da influência de uma determinada característica sobre outra (CRUZ e REGAZZI, 1997; VENCOSKY, 1978).

Com relação ao método a ser utilizado para estimar parâmetros genéticos existem diversos, no entanto, para o melhoramento de plantas perenes, Resende (2000) cita que o uso de técnicas de avaliação genética com base em modelos mistos REML/BLUP (máxima verossimilhança restrita/melhor predição linear não viciada) é fundamental para a predição de valores genéticos aditivos e genotípicos de indivíduos com potencial para seleção, tanto em nível intrapopulacional como interpopulacional.

Considerando a necessidade de aumentar a eficiência na obtenção de cultivares de hemerocales com porte mediano e grande produção de botões florais, o presente trabalho teve como objetivo estimar parâmetros genéticos, bem como as correlações entre os caracteres quantitativos, e selecionar famílias com valores genotípicos superiores.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no período de 2004 a 2007, na empresa Agrícola da Ilha, Ltda, localizada no município de Joinville, SC, situada nas coordenadas cartográficas de 26°18'16" latitude sul, 48°50'44" longitude oeste, na altitude entre 0 e 4,5 m acima do nível do mar. O clima é classificado como mesotérmico úmido, temperatura média anual 22,11 °C, sendo a média das máximas 30,6 °C e a média das mínimas 13,7 °C, com precipitação média mensal 136,22 mm e umidade relativa do ar 82,4% (Fundação Pesquisa e Planejamento para o Desenvolvimento Sustentável de Joinville, 2004).

3.2.2 HIBRIDAÇÃO

Inicialmente foi realizada a seleção de 13 cultivares americanas de hemerocale diplóides (Tabela 1). Estas cultivares foram selecionadas considerando o porte da planta e o número de botões por haste. Seis plantas de cada cultivar foram medidas. O porte da planta foi medido com uma trena graduada desde o nível do solo até a extremidade da haste, incluindo as flores. A partir destas medições, as plantas foram classificadas como: de porte alto (altura superior a 80 cm), porte médio (de 60 a 80 cm de altura) e porte baixo (de 35 a 60 cm). Em relação ao número de flores por haste, foi realizada a contagem do número de botões por haste, com os valores obtidos, foi calculada uma média. Plantas com média superior a 15 botões por haste, foram consideradas com alta produção de botões por haste, de 8 a 15 botões por haste, média produção e inferior a 8 flores por haste, baixa produção.

Após a seleção dos genitores, foram realizados os cruzamentos que consistiram em autofecundação e em cruzamentos recíprocos (Tabela 2).

As flores destinadas a fornecer e receber o pólen foram protegidas 24 horas antes da antese com um saco de papel parafinado. Com a abertura da flor, o pólen da flor doadora foi coletado com o auxílio de um palito e em seguida levado à flor

receptora. Após a polinização, foi esperado um período de 10 semanas para o desenvolvimento e a maturação das sementes.

TABELA 1 - Porte da planta (P), número de botões por haste (NBH), classificação quanto à ploidia, dormência e parentais. Joinville, SC, 2004.

NI	Cultivar	P ⁽¹⁾ (m)	NBH ⁽²⁾	Ploidia	Classificação dormência	Parentais
50	'Caribbean Snowcap'	0,80	11,33	Diplóide	Sempre-verde	'Caribbean D. Elkens' x 'Just Celebrate'
51	'Gentle Shepherd'	0,67	18,75	Diplóide	Sempre-verde	"Seedling" x "seedling"
54	'Stolen Treasure'	0,41	9,5	*	Dormente	'Border Crossing' x "seedling"
56	'Sugar Candy'	0,56	6,4	*	Dormente	*
61	'Siloam Nugget'	0,42	6,2	Diplóide	Dormente	*
65	'Cinderella's Dark Side'	0,52	12,75	Diplóide	Dormente	('Pardom me' x 'Elleanor Apps') x 'Little Squiz'
66	'Siloam June Bug'	0,68	13,8	Diplóide	Dormente	*
70	'Dragons Eye'	0,61	11,8	*	Semi-dormente	'Enchartes Spell' x 'Janice Brown'
72	'Siloam Show Girl'	0,73	22,2	Diplóide	Dormente	*
76	'Double Cranberry Ruffles'	0,68	14,16	Diplóide	Sempre verde	'Stroke of Midnight' x 'Siloam Double Rose'
80	'Green Spider'	0,85	11,8	Diplóide	Dormente	'Parfait' x "seedling"
82	'Cleopatra'	1,19	15,5	Diplóide	Sempre-verde	*
526	'Snowing Down South'	0,76	13,5	Diplóide	Semi-dormente	'Gentle Shepherd' x "seedling"

(1) Alto acima de 0,80 m; Médio de 0,60 a 0,80 m; Baixo de 0,35 a 0,60 m.

(2) Alto acima de 15 botões/haste; Médio de 8 a 15 botões/haste; Baixo inferior a 8 botões/haste.

- ploidias e parentais não conhecidos e/ou não citados nos registros do "The American Hemerocallis Society".
- NI – número de identificação dos parentais de acordo com os registros da Agrícola da Ilha, Ltda.

TABELA 2 - Cruzamentos efetuados entre cultivares americanas de hemerocale. Joinville, SC, 2004.

Número do cruzamento	Cruzamentos efetuados em relação ao	Característica dos parentais	Número de identificação dos parentais
DL 1	Porte	Alto X Alto	82 X 82
DL 2	Porte	Médio X Alto	66 X 82
DL 3	Porte	Alto X Médio	82 X 66
DL 4	Porte	Baixo X Alto	56 X 82
DL 5	Porte	Alto X Baixo	82 X 56
DL 6	Porte	Médio X Médio	526 X 526
DL 7	Porte	Baixo X Médio	65 X 526
DL 8	Porte	Médio X Baixo	526 X 65
DL 9	Porte	Alto X Médio	50 X 526
DL 10	Porte	Médio X Alto	526 X 50
DL 11	Porte	Baixo X Baixo	54 X 54
DL 12	Porte	Médio X Baixo	51 X 54
DL 13	Porte	Baixo X Médio	54 X 51
DL 14	Porte	Alto X Baixo	80 X 54
DL 15	Porte	Baixo X Alto	54 X 80
DL 16	Número de botões florais	Alto X Alto	72 X 72
DL 17	Número de botões florais	Médio X Alto	66 X 72
DL 18	Número de botões florais	Alto X Médio	72 X 66
DL 19	Número de botões florais	Baixo X Alto	61 X 72
DL 20	Número de botões florais	Alto X Baixo	72 X 61
DL 21	Número de botões florais	Médio X Médio	70 X 70
DL 22	Número de botões florais	Baixo X Médio	54 X 70
DL 23	Número de botões florais	Médio X Baixo	70 X 54
DL 24	Número de botões florais	Alto X Médio	76 X 70
DL 25	Número de botões florais	Médio X Alto	70 X 76
DL 26	Número de botões florais	Baixo X Baixo	56 X 56
DL 27	Número de botões florais	Médio X Baixo	526 X 56
DL 28	Número de botões florais	Baixo X Médio	56 X 526
DL 29	Número de botões florais	Alto X Baixo	51 X 56
DL 30	Número de botões florais	Baixo X Alto	56 X 51

3.2.3 SEMEADURA

Passado o período de maturação, de aproximadamente 70 dias, as sementes foram coletadas dos frutos e colocadas para secar à sombra durante 48 h. Após o período de secagem, as sementes foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células, com capacidade de 30 mL, contendo 100% de fibra de coco. Para a emergência das plântulas as bandejas foram colocadas em ambiente protegido, túnel plástico. As plântulas receberam regularmente irrigação manual, com auxílio de regador.

3.2.3.1 Transplante das plântulas

Após a emergência das plântulas, período aproximado de 60 dias, as mudas foram transplantadas para canteiros com 1 m de largura e 52 m de comprimento, espaçadas de 30 x 40 cm. O solo foi primeiramente arado e em seguida aplicado adubo orgânico (3 kg.m^{-2} de esterco de galinha curtido) + 100 gr.m^{-2} de adubo químico NPK na formulação 10-10-10 em sulcos longitudinais. As plantas receberam irrigação manual durante um mês, com auxílio de regador. Após esse período as plantas não foram mais irrigadas.

Após um mês de transplante foi espalhado serragem nos canteiros experimentais, para manter a umidade do solo e também proteger da invasão de plantas daninhas.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos incompletos com 24 tratamentos (quatro autofecundações e 20 cruzamentos), com uma a quatro repetições e número variável de 4 a 10 plantas por parcela. O número de repetições e de plantas por parcela variou devido ao baixo número de sementes produzidas e conseqüentemente de mudas obtidas.

3.2.3.2 Manutenção dos canteiros

Durante os três anos de condução do experimento foram realizadas duas podas foliares anuais: a primeira após o florescimento, em março, e a segunda em julho. As folhas foram cortadas deixando aproximadamente 10 cm de parte aérea. Em seguida aplicou-se adubo orgânico (3 kg.m^{-2} de esterco de galinha curtido) + 100

gr.m⁻² de adubo químico NPK em sulcos na formulação 10-10-10 após a primeira poda e 4-14-8 na segunda poda.

Durante todo o período da pesquisa, mensalmente, foi realizada a retirada manual das plantas daninhas dos canteiros.

3.2.4 CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS

A avaliação das características quantitativas: altura de plantas; comprimento e largura da folha; número de haste por planta; número de botões florais por haste e número de botões florais por planta foi realizada após três anos do transplante das mudas para o campo.

A altura da planta foi medida em centímetros, com uma trena graduada desde o nível do solo, junto à planta, até a extremidade da haste. Para o comprimento e largura das folhas também foi utilizada uma trena graduada. O comprimento da folha foi medido desde a coroa até a extremidade da folha e a largura foi medida na região mediana da folha. A contagem do número de hastes, número de botões florais por haste e número de botões florais por planta foi feita na mesma ocasião e nas mesmas plantas utilizadas para a avaliação dos caracteres anteriormente citados.

Estimativas dos componentes de variância e dos parâmetros genéticos foram obtidas por meio do programa computacional denominado SELEGEN – REML/BLUP, desenvolvido por Resende (2002b) para o melhoramento de plantas perenes.

Para a análise das variáveis adotou-se o Modelo Estatístico 38 (blocos incompletos, várias plantas por parcela, genitores não aparentados).

3.2.5 ANÁLISE GENÉTICA VIA REML/BLUP

A avaliação genética das famílias foi realizada, usando o procedimento ótimo e padrão para predição de valores genéticos denominado BLUP individual, usando estimativas de componentes de variância obtidas pelo método denominado REML sob o modelo individual, descrito por Resende (2002b). Para realizar a análise genética, adotou-se o programa computacional SELEGEN-REML/BLUP, utilizando o modelo estatístico 38.

3.2.5.1 Modelo Estatístico 38 - blocos incompletos, vários genótipos por parcela, genitores não aparentados

A sequência de colunas no arquivo de dados para análise empregando o Modelo estatístico 38, no programa computacional SELEGEN-REML/BLUP (RESENDE, 2002b) é a seguinte:

Indivíduo, Pai, Mãe, Repetição, Parcela, Progenie, Bloco, Árvore, Variáveis.

A avaliação de famílias de irmãos germanos obtidas sob cruzamento dialélico desbalanceado, no delineamento de blocos incompletos, com várias plantas por parcela consistiu do seguinte modelo estatístico:

$$y = Xr + Za + Wp + Sf + Tb + e, \text{ em que:}$$

y : vetor de dados;

r : vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral;

a : vetor dos efeitos genéticos aditivos individuais (assumidos como aleatórios);

p : o vetor de efeitos de parcelas (aleatórios);

f : vetor dos efeitos genéticos de dominância associado a famílias de irmãos germanos (assumidos como aleatórios);

b : vetor dos efeitos dos blocos incompletos (aleatórios);

e : vetor de erros ou resíduos (aleatórios).

X , Z , W , S , e T = representam as matrizes de incidência para os efeitos de r , a , p , f , e b , respectivamente.

Distribuições e estruturas de médias e variâncias:

$$y | r, V \sim N(Xr, V)$$

$$a | A, \sigma_a^2 \sim N(0, A\sigma_a^2)$$

$$p | \sigma_p^2 \sim N(0, I\sigma_p^2)$$

$$f | \sigma_f^2 \sim N(0, I\sigma_f^2)$$

$$b | \sigma_b^2 \sim N(0, I\sigma_b^2)$$

$$e | \sigma_e^2 \sim N(0, I\sigma_e^2)$$

$$\text{Cov}(a, p') = 0; \text{Cov}(a, f') = 0; \text{Cov}(a, b') = 0; \text{Cov}(a, e') = 0;$$

$$\text{Cov}(p, f') = 0; \text{Cov}(p, b') = 0; \text{Cov}(p, e') = 0; \text{Cov}(f, b') = 0;$$

$\text{Cov}(f, e') = 0$; $\text{Cov}(b, e') = 0$, ou seja:

$$E = \begin{bmatrix} y \\ a \\ p \\ f \\ b \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} Xr \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}; \quad \text{Var} \begin{bmatrix} y \\ a \\ p \\ f \\ b \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} V & ZA\sigma_a^2 & Wl\sigma_p^2 & Sl\sigma_f^2 & Tl\sigma_b^2 & l\sigma_e^2 \\ A\sigma_a^2 Z' & A\sigma_a^2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ l\sigma_p^2 W' & 0 & l\sigma_p^2 & 0 & 0 & 0 \\ l\sigma_f^2 S' & 0 & 0 & l\sigma_f^2 & 0 & 0 \\ l\sigma_b^2 T' & 0 & 0 & 0 & Tl\sigma_b^2 & 0 \\ l\sigma_e^2 & 0 & 0 & 0 & 0 & l\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

$$V = \text{Var}(Y) = ZA\sigma_a^2 Z' + Wl\sigma_p^2 W' + Sl\sigma_f^2 S' + Tl\sigma_b^2 T' + l\sigma_e^2,$$

A é a matriz de correlação genética aditiva entre os indivíduos em avaliação.

Equações de modelo misto:

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'W & X'S & X'T \\ Z'X & Z'Z + A^{-1}\lambda_1 & Z'W & Z'S & Z'T \\ W'X & W'Z & W'W + l\lambda_2 & W'S & W'T \\ S'X & S'Z & S'W & S'S + l\lambda_3 & S'W \\ T'X & T'Z & T'W & T'S & T'T + l\lambda_4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{r} \\ \hat{a} \\ \hat{p} \\ \hat{f} \\ \hat{b} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ W'y \\ S'y \\ T'y \end{bmatrix}, \text{ em que:}$$

$$\lambda_1 = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_a^2} = \frac{1 - h^2 - p^2 - f^2 - b^2}{h^2};$$

$$\lambda_2 = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_p^2} = \frac{1 - h^2 - p^2 - f^2 - b^2}{p^2};$$

$$\lambda_3 = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_f^2} = \frac{1 - h^2 - p^2 - f^2 - b^2}{f^2};$$

$$\lambda_4 = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_b^2} = \frac{1 - h^2 - p^2 - f^2 - b^2}{b^2}.$$

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_p^2 + \sigma_f^2 + \sigma_b^2 + \sigma_e^2}: \text{herdabilidade individual no sentido restrito};$$

$$p^2 = \frac{\sigma_p^2}{\sigma_a^2 + \sigma_p^2 + \sigma_f^2 + \sigma_b^2 + \sigma_e^2}: \text{coeficiente de determinação dos efeitos parcela};$$

$$f^2 = \frac{\sigma_f^2}{\sigma_a^2 + \sigma_p^2 + \sigma_f^2 + \sigma_b^2 + \sigma_e^2}: \text{coeficiente de determinação dos efeitos da capacidade}$$

específica de combinação;

$$b^2 = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_a^2 + \sigma_p^2 + \sigma_f^2 + \sigma_b^2 + \sigma_e^2} : \text{coeficiente de determinação dos efeitos bloco};$$

σ_a^2 : variância genética aditiva;

σ_{par}^2 : variância entre parcelas;

σ_f^2 : variância da capacidade específica de combinação ou variância genética de dominância entre as famílias de irmãos germanos;

σ_b^2 : variância entre blocos;

σ_e^2 : variância residual ou erro;

Estimadores iterativos de componentes de variância por REML via algoritmo em:

$$\hat{\sigma}_e^2 = [y'y - \hat{r}'X'y - \hat{a}'Z'y - \hat{p}'W'y - \hat{f}'S'y - \hat{b}'T'y] / [N - r(x)]$$

$$\hat{\sigma}_a^2 = [\hat{a}'A^{-1}\hat{a} + \hat{\sigma}_e^2 \text{tr}(A^{-1}C^{22})] / q$$

$$\hat{\sigma}_{par}^2 = [\hat{p}'\hat{p} + \hat{\sigma}_e^2 \text{tr}C^{33}] / s_1$$

$$\hat{\sigma}_f^2 = [\hat{f}'\hat{f} + \hat{\sigma}_e^2 \text{tr}C^{44}] / t$$

$$\hat{\sigma}_b^2 = [\hat{b}'\hat{b} + \hat{\sigma}_e^2 \text{tr}C^{55}] / s_2$$

sendo que:

C^{22} , C^{33} , C^{44} e C^{55} são derivados de C^{-1} ;

$$C^{-1} = \begin{bmatrix} C_{11} & C_{12} & C_{13} & C_{14} & C_{15} \\ C_{21} & C_{22} & C_{32} & C_{24} & C_{25} \\ C_{31} & C_{32} & C_{33} & C_{34} & C_{35} \\ C_{41} & C_{42} & C_{43} & C_{44} & C_{45} \\ C_{51} & C_{52} & C_{53} & C_{54} & C_{55} \end{bmatrix}^{-1} = \begin{bmatrix} C^{11} & C^{12} & C^{13} & C^{14} & C^{15} \\ C^{21} & C^{22} & C^{23} & C^{24} & C^{25} \\ C^{31} & C^{32} & C^{33} & C^{34} & C^{35} \\ C^{41} & C^{42} & C^{43} & C^{44} & C^{45} \\ C^{51} & C^{52} & C^{53} & C^{54} & C^{55} \end{bmatrix}$$

C: matriz dos coeficientes das equações de modelo misto;

tr: operador de traço matricial;

r(x): posto da matriz X;

N, q, s_1 , t e s_2 : número total de dados, número total de parentes, número total de parcelas, número total de cruzamentos e número total de blocos, respectivamente.

O estimador do componente de variância de dominância entre famílias é dado por $\sigma_f^2 = (1/4) \sigma_d^2$. Isto é igual ao componente de variância associada com a capacidade específica de combinação. Neste caso, σ_f^2 é igual a ¼ da variância genética de dominância total presente na população.

A herdabilidade média da família (\hat{h}_{mf}^2) foi estimada por:

$$\hat{h}_{mf}^2 = \{ (1/2) \times \sigma_a^2 + \sigma_d^2 \} / (1/2) \times \sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_{par}^2 / n_{rep}^0 + (\sigma_e^2 + 1/2 \sigma_a^2) / (n_{planta}^0 \times n_{rep}^0),$$

onde:

n_{rep}^0 : número de repetições;

n_{planta}^0 : número de plantas por parcela.

A variância genotípica entre famílias (σ_p^2) foi estimada por:

$$\sigma_p^2 = (\sigma_a^2/2) + \sigma_d^2$$

Variância do erro de predição dos valores genotípicos (PEV):

$$PEV = (1 - \hat{h}_{mf}^2) \times \sigma_p^2$$

Desvio padrão do valor genotípico predito (SEP):

$$SEP = \sqrt{PEV}$$

Acurácia seletiva entre famílias (Ac_{fam}):

$$Ac_{fam} = \sqrt{\hat{h}_{mf}^2}$$

Coeficiente de variação genética (CV_{gi} %):

$$CV_{gi} \% = (\sigma_p^2 / MG) \times 100$$

Onde;

MG = Média geral

Coeficiente de variação ambiental (CV_e %):

$$CV_e \% = \left\{ \sqrt{[\sigma_{par}^2 + \sigma_e^2 + (\sigma_a^2 / 2) / n_{planta}^0]} / MG \right\} \times 100$$

Coeficiente de variação relativa (CVr):

$$CV_r = CV_{gi} \% / CV_e \%$$

3.2.5.2 Correlação entre caracteres

As correlações genotípicas entre pares de caracteres analisadas em nível de indivíduos (altura de plantas; comprimento e largura da folha, número de haste por

planta, número de botões florais por haste e número de botões florais por planta) foram calculadas a partir das médias genotípicas obtidas pelo BLUP individual analisados através do Modelo Estatístico 38, conforme descrito pela fórmula:

$$\sigma_{ij} = \sigma_{ij} / \sigma_i \cdot \sigma_j$$

σ_{ij} : covariância genotípica entre o caractere *i* e *j*.

σ_i : desvio padrão genotípico para o caractere *i*.

σ_j : desvio padrão genotípico para o caractere *j*.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 HIBRIDAÇÃO

Dos 30 cruzamentos realizados no presente trabalho foram obtidas 26 famílias. Quatro cruzamentos DL 1 e 21 (auto-fecundações) e, DL 7 e 22 (fecundações cruzadas) falharam devido ao aborto dos frutos. Alguns frutos abortaram após sete dias da polinização, outros levaram um tempo maior, aproximadamente 14 dias (Tabela 3 e Figura 4). Uma das possíveis causas para esse resultado é a auto-incompatibilidade. Para o gênero *Hemerocallis* a auto-incompatibilidade pode ser classificada como pós-zigótica que possivelmente pode ter ocorrido a inibição ovariana precedente à penetração dos óvulos a qual se processa no tecido transmissor do ovário, ou na epiderme da placenta (RIESEBERG e CARNEY, 1998). Tal fenômeno foi verificado em *Lilium candidum* e *Lilium szovitsianum* (BROCK, 1954) e *Hemerocallis thunbergi* e *Hemerocallis citrina* (STOUT e CHANDLER, 1933). Em todos estes casos, uma pequena parcela de tubos polínicos resultantes de auto-fecundações alcançaram e penetraram os óvulos.

Com relação à taxa de fecundação em plantas autofecundadas, foi observado que as plantas que obtiveram frutos apresentaram taxa inferior a 20%, exceção do cruzamento DL 16 (Tabela 3). Esse resultado possivelmente deve-se ao fato de que alguns hemerocales apresentam incapacidade de produzir sementes por meio de auto-fecundação (STOUT e CHANDLER, 1933). Isto é devido à incompatibilidade de fertilizar indivíduos ou clones que são debilmente compatíveis. Em adição, Gibbs (1986) também cita que na maioria dos casos a auto-incompatibilidade se expressa por uma baixa produtividade de frutos e sementes em auto-fecundações, quando comparado ao número de sementes e frutos formados por polinizações cruzadas, tal resposta pode ser verificada na Tabela 3.

O baixo número de frutos e sementes obtidas também foi observado em cruzamentos recíprocos (Tabela 3). Dos 24 cruzamentos recíprocos, oito apresentaram porcentagem de flores fecundadas inferior a 25%. Para esse resultado a diferença do nível de ploidia não pode teoricamente ser rejeitada como possível explicação, visto que para algumas cultivares de hemerocale de origem americana utilizadas nos cruzamentos não se tem dados referentes à suas ploidias (Tabela 1).



FIGURA 4 - Abortamento de frutos em plantas de hemerocale. Joinville, SC, 2004.

No segundo ano, foi realizada a avaliação dos cruzamentos obtidos, no entanto, foi possível obter resultados em 22 famílias (duas famílias não floresceram e outras duas: a família 16 e 26 não sobreviveram no campo devido ao ataque de formigas). Vale ressaltar que dentro das famílias obtidas algumas repetições não floresceram. No terceiro ano houve a emissão das hastes florais de todas as famílias obtidas, totalizando 24 famílias.

É possível supor que tal resultado seja devido ao fato de que essas plantas foram originadas de sementes, e, segundo Nau (1995) tais plantas podem levar de dois a três anos para florescer. Outra hipótese que pode ser citada seriam os fatores externos que influenciam grandemente na atividade de crescimento tais como: temperatura, fotoperíodo, qualidade da luz, temperatura durante o período de luz e escuro, condições nutricionais e suplementação de água (VEGIS, 1964; POETHIC, 1990; DE JONG, 1991; ERWIN, 2006). Dos fatores citados, o estresse hídrico e a baixa temperatura podem ter influenciado no prolongamento do período juvenil de hemerocale devido às variações climáticas que ocorreram durante o experimento.

Poderia também supor que o atraso da emissão da haste floral ocorreu devido ao fato de que, a maioria dos parentais utilizados para a obtenção das famílias, de acordo com “American Hemerocallis Society”, é classificada como dormentes ou semi-dormentes (Tabela 1). Essa característica é considerada hereditária, com o início, duração e fim do período vegetativo geneticamente determinado. No entanto, não se pode esquecer que essas propriedades podem ser modificadas por fatores externos (VEGIS, 1964), e que as cultivares podem apresentar diferentes comportamentos daqueles registrados, visto que se desenvolvem em ambientes diferentes daqueles que foram originadas (ERHARDT, 1992; GATLIN, 1999).

TABELA 3 - Número de flores polinizadas, número de frutos obtidos e porcentagem de fecundação em cruzamentos que consistiram em autofecundações e cruzamentos recíprocos realizados em hemerocale. Joinville, SC, 2004.

Cruzamentos	Número de flores polinizadas	Número de frutos obtidos	Porcentagem de fecundação
DL 1 = 82 X 82	90	0	0,00
DL 2 = 66 X 82	12	10	83,33
DL 3 = 82 X 66	5	1	20,00
DL 4 = 56 X 82	77	7	9,09
DL 5 = 82 X 56	60	48	80,00
DL 6 = 526 X 526	35	4	11,42
DL 7 = 65 X 526	30	0	0,00
DL 8 = 526 X 65	12	8	66,66
DL 9 = 50 X 526	16	4	25,00
DL 10 = 526 X 50	22	15	68,18
DL 11 = 54 X 54	35	1	2,85
DL 12 = 51 X 54	45	3	6,66
DL 13 = 54 X 51	14	10	71,42
DL 14 = 80 X 54	75	3	4,00

TABELA 3 - Número de flores polinizadas, número de frutos obtidos e porcentagem de fecundação em cruzamentos que consistiram em autofecundações e cruzamentos recíprocos realizados em hemerocale. Joinville, SC, 2004. (continuação)

Cruzamentos	Número de flores polinizadas	Número de frutos obtidos	Porcentagem de fecundação
DL 15 = 54 X 80	25	7	28,00
DL 16 = 72 X 72	25	10	40,00
DL 17 = 66 X 72	9	1	11,1
DL 18 = 72 X 66	8	4	50,00
DL 19 = 61 X 72	8	5	62,5
DL 20 = 72 X 61	6	2	33,33
DL 21 = 70 X 70	13	0	0,00
DL 22 = 54 X 70	27	0	0,00
DL 23 = 70 X 54	13	2	15,38
DL 24 = 76 X 70	8	4	50,00
DL 25 = 70 X 76	5	2	40,00
DL 26 = 56 X 56	71	11	15,49
DL 27 = 526 X 56	20	15	75,00
DL 28 = 56 X 526	8	2	25,00
DL 29 = 51 X 56	7	3	42,85
DL 30 = 56 X 51	26	11	42,30

3.3.2 COMPONENTES DE VARIÂNCIA E PARÂMETROS GENÉTICOS

Os componentes de variância e os parâmetros genéticos estimados via procedimento REML/BLUP estão apresentados na Tabela 4. Esse método se mostrou adequado para estimativas de parâmetros genéticos em hemerocale, com alta confiabilidade conforme evidenciado pela elevada acurácia (variando de 0,82 a 0,94).

Os coeficientes de variação ambiental (Cve%) obtidos para os caracteres altura de planta, comprimento e largura de folha variaram de 8,83 a 15,63%, esses valores podem ser considerados baixos e demonstram boa precisão para o ensaio e para o critério de avaliação. Para os caracteres número de hastes, número de

botões florais por haste e por planta tais valores apresentaram-se mais elevados, variando de 28,77 a 38,30%.

Os coeficientes de variação genética (CVg%), que expressam em porcentagem a média geral da quantidade de variação genética existente, sugerem a existência de variabilidade genética com possibilidade de seleção para os caracteres altura de planta, comprimento de folha, largura de folha, número de hastes e número de botões florais por planta, pois os valores situaram-se entre 11,12% a 27,48%. Tais resultados indicam a possibilidade de encontrar indivíduos superiores que poderão proporcionar ganhos com a seleção, pois apresentaram valores acima de 10% confirmando a presença de considerável variabilidade genética (RESENDE, 2002a).

Para o caráter número de botões florais por haste, a variação genética foi de 1,14%, o que restringe a seleção com base nesse caráter, devido à ausência de variabilidade genética. Esse resultado permite inferir que é necessário a introdução de novos materiais contrastantes na população para aumentar a variação genética (FALCONER, 1987).

Os valores dos coeficientes de determinação dos efeitos de parcela (C^2_{parc}) foram baixos para todos os caracteres, indicando uma baixa variabilidade ambiental entre parcelas dentro de bloco.

As estimativas obtidas para os valores de herdabilidade no sentido restrito apresentaram magnitude variável em todos os caracteres avaliados (Tabela 4). De acordo com classificação descrita por Resende (2002a), a herdabilidade pode ser considerada como de baixa magnitude quando \hat{h}^2_a é menor que 0,15; média magnitude entre 0,15 a 0,50 e alta magnitude com \hat{h}^2_a maior que 0,50, ao nível de indivíduos.

Valores obtidos de herdabilidade individual para altura de planta (0,52) e comprimento de folha de hemerocale (0,39), considerados de alta a média magnitude indicam a possibilidade de se realizar a seleção individual, mas para comprovar eficiência neste tipo de seleção é importante considerar a variação do erro padrão. Verificando a Tabela 4 nota-se que os desvios foram inferiores ao valor da herdabilidade no sentido restrito individual, portanto, haveria possibilidade de selecionar indivíduos dentro de famílias e com base nestas características.

Herdabilidades da média da família \hat{h}_{mf}^2 apresentaram estimativas superiores quando comparadas às estimativas de herdabilidade no sentido restrito individual (Tabela 4). As referidas herdabilidades foram superiores a 0,60. Estes resultados evidenciam que existe vantagem em usar informação da família. Corroborando com esse resultado Toms *et al.* (1994) demonstraram que a seleção de família induz a uma maior resposta do que a seleção individual. Harding *et al.* (1981) também verificaram um aumento na estimativa da herdabilidade para produção de flores de gérbera, no sentido amplo individual a estimativa foi de 42%, enquanto que para média de família foi de 68%, sugerindo-se seleção de famílias para se ter sucesso na produção de flores.

Os resultados indicam a seleção de famílias para hemerocale, no entanto, para que essa seleção seja efetiva a precisão experimental deve ser alta. E segundo Gómez e Gómez (1984) vários fatores tais como heterogeneidade do solo, material (planta), sistema de manutenção afetam a acurácia experimental.

Utilizar informações de progênies e parentes permite elevar a acurácia seletiva da variável de baixa para moderada, pois será utilizado um maior número de informações (RESENDE, 2002a). Isto pode ser verificado na estimativa de herdabilidade ao nível de família de moderada a altas magnitudes, variando de 0,67 para número de botões florais por planta e 0,89 para altura de planta. As magnitudes de herdabilidade conduziram a um valor de acurácia para seleção de famílias de 0,82 a 0,94 (Tabela 4), o que indica uma boa precisão dos resultados. Corroborando com os resultados obtidos, Çamas e Esendal (2006) e Costa *et al.* (2007) estudando *Carthamus tinctorius* L. e *Heliconia psittacorum*, obtiveram altas estimativas de herdabilidades em nível de família para o caráter altura de plantas 0,93 e 0,85, respectivamente.

TABELA 4 - Estimativa dos componentes de variância e parâmetros genéticos para as variáveis: altura de planta (AP), comprimento de folha (CF), largura de folha (LF), número de hastes (NH), número de botões florais por haste (NBH), número de botões florais por planta (NBP) de 24 famílias de irmãos germanos de hemerocale. Joinville, SC, 2007.

Parâmetros ¹	AP	CF	LF	NH	NBH	NBP
σ_a^2	117,6300	73,1198	0,10875	5,83015	0,0078	330,9905
σ_{parc}^2	0,00087	0,00067	0,00002	0,00000	2,4700	0,7302
σ_f^2	0,03159	0,0361	0,00018	0,01650	0,0303	463,035
σ_{bloc}^2	0,0003	0,00006	0,00673	0,00000	0,02918	12,1064
σ_e^2	108,470	113,8793	0,5142	29,1835	28,4906	3107,5220
σ_y^2	226,110	187,0089	0,6297	35,0178	31,0052	3567,1080
\hat{H}_a^2	0,520±0,15	0,390±0,13	0,172±0,08	0,166±0,08	0,0002±0,003	0,092±0,06
\hat{H}_g^2	0,52037	0,3911	0,1729	0,1669	0,001230	0,2225
C_{parc}^2	0,0000	0,00000	0,00004	0,0000	0,07966	0,00020
C_{fam}^2	0,00003	0,00004	0,00007	0,00011	0,00024	0,03245
C_{bloc}^2	0,00000	0,00000	0,01069	0,00000	0,00094	0,0033
MG	59,7914	54,3363	1,9693	6,9881	9,3389	61,0111
σ_p^2	58,8229	36,5689	0,05442	2,91913	0,01149	281,254
\hat{h}_{mf}^2	0,8940	0,83368	0,69665	0,68579	0,00632	0,67316
PEV	6,2319	5,35091	0,01651	0,91721	0,01141	91,9254
SEP	2,4963	2,3132	0,12849	0,95771	0,10684	9,58777
Ac_{fam}	0,9455	0,92395	0,83466	0,82813	0,07953	0,82046
$CV_{gi}(\%)$	12,828	11,129	11,846	24,449	1,148	27,488
$CV_e(\%)$	8,831	9,215	15,634	33,098	28,770	38,307
CVr	1,452	1,208	0,758	0,739	0,040	0,718

¹ variância genética aditiva (σ_a^2), variância entre parcelas (σ_{parc}^2), variância genética de dominância entre famílias (σ_f^2), variância entre blocos (σ_{bloc}^2), variância residual entre parcelas (σ_e^2), variância fenotípica individual (σ_y^2), herdabilidade individual no sentido restrito (\hat{H}_a^2), herdabilidade individual no sentido amplo (\hat{H}_g^2), coeficiente de determinação dos efeitos de parcela (C_{parc}^2), coeficiente de determinação dos efeitos das famílias (C_{fam}^2), coeficiente de determinação dos efeitos dos blocos (C_{bloc}^2), média geral (MG), variância genotípica entre famílias (σ_p^2), herdabilidade da média da família no sentido amplo (\hat{h}_{mf}^2), variância do erro de predição dos valores genotípicos (PEV), desvio padrão do valor genotípico predito (SEP), acurácia seletiva entre famílias (Ac_{fam}), coeficiente de variação genética (CV_{gi}), coeficiente de variação ambiental (CV_e), coeficiente de variação relativa (CVr).

O número de botões florais por haste apresentou estimativas muito baixas tanto para herdabilidade individual (0,0002) quanto para herdabilidade de média de família (0,006), revelando ausência de variação genética aditiva na população (0,0078) e, conseqüentemente, a estimação de ganhos genéticos de baixa magnitude, portanto não se deve utilizar esse parâmetro para seleção para esta população. Possivelmente esses resultados podem estar relacionados aos fatores que podem influenciar as estimativas de herdabilidade tais como: a característica a ser estimada, ao método de estimativa, a diversidade da população, a unidade experimental, a precisão na condução do experimento e na coleta dos dados, (FALCONER, 1987; BORÉM e MIRANDA, 2005). De acordo com Falconer (1987), se o caráter apresentar valor zero ou quase nulo para herdabilidade, não existindo variância genética, a seleção efetuada não promoverá ganho genético, pois toda a diferença entre os indivíduos será ambiental. Resultados semelhantes foram obtidos para *Saxifraga granulata* em que o caráter número de flores foi altamente influenciado pelo ambiente e apresentou uma estimativa muito baixa de 0,11 (ANDERSON, 1996). Em contrapartida, para crisântemo Jong (1984) verificou que o caráter número de flores apresentou uma alta variação genética e conseqüentemente um alto valor de herdabilidade no sentido amplo (70%).

Comportamento inverso ocorreu para número de botões florais por planta, em que as estimativas de herdabilidade individual foram 0,092 e a herdabilidade da média de família foi 0,67, podendo ser utilizado como um parâmetro de seleção. Possivelmente, essa grande diferença tenha ocorrido devido ao fato desse caráter ter apresentado um maior valor de coeficiente de variação genética (27,48%). Segundo Rocha *et al.* (2006) o coeficiente de variação genética sugere a existência de variabilidade genética, quanto maior esse valor, maior será o valor da herdabilidade e conseqüentemente maior é a facilidade de encontrar indivíduos superiores que irão proporcionar ganhos com a seleção. Confirmando a afirmativa Ram *et al.* (2005) estudando a variabilidade genética e estudos de correlação na espécie *Silybum marianum* Gaertn obtiveram um alto valor de coeficiente de variação genotípica e conseqüentemente altos valores de herdabilidades para altura de plantas, diâmetro de caule e número de cápsulas por planta.

A seleção de plantas para caracteres governados por mais de um gene é, muitas vezes, uma tarefa difícil de ser conduzida. Neste sentido, a utilização de caracteres correlacionados pode favorecer na identificação dos melhores indivíduos,

para que estes sejam selecionados. Com base nisso, foram estimadas as correlações genéticas entre os caracteres avaliados (Tabela 5).

As correlações genéticas, na maioria dos caracteres, não foram muito elevadas e significativas. Exceção para os caracteres número de folhas e número de botões florais por haste (-0,0972) e número de hastes e número de botões florais por haste (-0,0403), as quais foram negativas e não significativas (Tabela 5). Estes resultados indicam a não existência de causas comuns de variação entre esses dois caracteres.

TABELA 5 - Coeficiente de correlação genotípica entre altura de planta (AP), comprimento da folha (CF), largura da folha (LF), número de hastes (NH), número de botões/haste (NBH) e número de botões /planta (NBP) em hemerocale. Joinville, SC, 2007.

Caracteres	AP	CF	LF	NH	NBH	NBP
A P	-	0,4709*	0,0626	0,2230	0,3506	0,4093*
C F	-	-	0,2093	0,1660	0,1596	0,2787
L F	-	-	-	0,1963	0,1528	-0,0972
N H	-	-	-	-	-0,0403	0,8496*
NBH	-	-	-	-	-	0,2191
NBP	-	-	-	-	-	-

* significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste t

O maior valor de correlação foi obtido entre número de hastes e número de botões florais por planta (0,84). Esse resultado indica que o aumento do número de hastes irá proporcionar o aumento do número de botões florais por planta. Resultado similar foi encontrado por Yu (1989) em gérbera de corte, porém o maior valor obtido foi para a correlação entre a produção e o comprimento do escapo (0,22). Com relação à produção Leffring (1973) obteve correlações positivas entre número de brotos laterais e número total de folhas, e número de brotos laterais e produção de flores de gérbera.

Altura de planta foi outro caráter que apresentou valores medianos e significativos de correlação entre os caracteres comprimento da folha (0,47) e número de botões florais por planta (0,40). Portanto houve uma relação direta entre

esses caracteres, e o aumento na altura de planta promoveria um aumento no comprimento da folha e no número de botões florais por planta.

Estes resultados permitem inferir que pode ser efetuada a seleção das famílias para os caracteres altura de planta e número de hastes visando o aumento do número de botões florais por planta. Esta seleção seria indireta, ou seja, baseada no melhoramento de um caráter complexo sobre a seleção de um caráter simples que pode ser determinado rapidamente ou que tem uma maior estimativa de herdabilidade no sentido amplo (LANGTON, 1991)

3.3.2.1 Seleção de famílias

Os valores genotípicos das famílias de irmãos germanos de hemerocales, considerando as variáveis altura de planta, comprimento e largura de folha, número de hastes, número de botões florais por haste e número de botões florais por planta, estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

De acordo com os resultados foi observado nove famílias com valores genotípicos acima da média para a variável altura de planta. As cinco primeiras famílias 15, 14, 3, 2 e 5, apresentaram superioridade média de 19,80% em relação à média experimental (59,79 cm). Considerando as melhores famílias 15, 14, 3, 2, 5, originárias de cruzamentos em que um dos parentais apresentava a classificação de porte alto (Tabela 2), pode-se inferir que o parental transmite sua característica indiferentemente quando ocupa posição de pai ou de mãe no cruzamento, promovendo um ganho genético.

Ao considerar os valores genotípicos das famílias para a variável comprimento da folha (Tabela 6) constata-se que as famílias 15, 14, 11, 3 e 2 apresentaram os melhores desempenhos genotípicos. A família 15 apresentou superioridade média de 21,59% em relação à média. Enquanto que para a variável largura de folha foi observado 16 famílias com valores genotípicos acima da média (1,96 cm). A seleção dessas famílias proporcionaria um ganho médio de 14,74%.

Os valores genotípicos das melhores famílias para número de haste em hemerocale, apresentados na Tabela 7, indicam haver nove famílias com valores genotípicos acima da média geral (6,98). A seleção entre essas nove famílias proporcionaria um ganho médio de 32,48%, sendo que essas famílias representam 37,5% das famílias avaliadas. Estes resultados indicam haver maior probabilidade

em selecionar clones potenciais para este caráter, dentro destas famílias. Entre as melhores, observa-se que a família 25, proveniente do cruzamento 76 x 70.

Para o caráter número de botões florais por haste, os valores genotípicos apresentaram-se muito próximos da média geral (9,33), o ganho seria muito baixo 0,19%, explicado pela baixa herdabilidade. Entretanto, para o caráter número de botões florais por planta, nove famílias apresentaram valores genotípicos superiores a média. A seleção dessas nove famílias proporcionaria um ganho médio de 38,64%. Com esses resultados pode se indicar o caráter número de botões florais por planta como caráter de seleção das progênies.

TABELA 6 - Valores genotípicos (Vgf) e média geral das 24 famílias de irmãos germanos de hemerocale, para as variáveis: altura de planta, comprimento e largura da folha. Joinville, SC, 2007.

Classificação	Altura da planta		Comprimento da folha		Largura da folha	
	Família	Vgf	Família	Vgf	Família	Vgf
1	DL 15	71,633	DL 15	66,693	DL 12	2,2494
2	DL 14	71,630	DL 14	66,684	DL 13	2,2492
3	DL 3	69,648	DL 11	65,036	DL 30	2,1464
4	DL 2	69,639	DL 3	59,815	DL 29	2,1457
5	DL 5	68,853	DL 2	59,809	DL 9	2,1343
6	DL 4	68,851	DL 23	57,516	DL 10	2,1341
7	DL 11	68,832	DL 5	55,451	DL 6	2,1155
8	DL 23	61,381	DL 4	55,436	DL 11	2,0677
9	DL 28	59,867	DL 13	53,984	DL 23	2,0387
10	DL 27	58,991	DL 12	53,980	DL 8	2,0249
11	DL 25	58,983	DL 18	53,255	DL 24	1,9946
12	DL 24	58,347	DL 17	53,248	DL 25	1,9939
13	DL 12	58,343	DL 8	52,580	DL 27	1,9884
14	DL 13	58,247	DL 10	52,321	DL 28	1,9884
15	DL 6	57,906	DL 9	52,318	DL 15	1,9724
16	DL 9	57,905	DL 24	51,704	DL 14	1,9720
17	DL 10	57,207	DL 25	51,700	DL 18	1,9645
18	DL 8	54,669	DL 6	50,873	DL 17	1,9642
19	DL 29	54,665	DL 20	50,091	DL 20	1,9512
20	DL 30	54,262	DL 19	50,089	DL 19	1,9511
21	DL 18	54,262	DL 28	49,406	DL 3	1,6363
22	DL 17	54,262	DL 27	49,403	DL 2	1,6357
23	DL 19	47,722	DL 29	45,428	DL 5	1,5942
24	DL 20	47,722	DL 30	45,427	DL 4	1,5941
Média Geral		59,791				1,969

Para os caracteres número de hastes e número de botões florais por planta, as cinco melhores famílias (25, 24, 2, 3, e 5) entre as melhores para as duas variáveis, alterando apenas a ordem de classificação das famílias. Estes resultados evidenciam o alto valor genotípico destes cruzamentos, considerando estes caracteres de seleção.

TABELA 7 - Valores genotípicos (Vgf) e média geral das 24 famílias de irmãos germanos de hemerocale, para as variáveis: número de hastes, número de botões florais por haste e número de botões florais por planta. Joinville, SC, 2007.

Classificação	Número de hastes		Número de botões florais por haste		Número de botões florais por planta	
	Família	Vgf	Família	Vgf	Família	Vgf
1	DL 25	9,258	DL 5	9,356	DL 5	84,593
2	DL 24	9,257	DL 29	9,352	DL 2	84,025
3	DL 2	8,964	DL 27	9,346	DL 3	78,468
4	DL 3	8,959	DL 30	9,345	DL 24	74,962
5	DL 5	8,717	DL 3	9,343	DL 25	73,726
6	DL 4	8,700	DL 28	9,343	DL 27	72,676
7	DL 23	7,484	DL 12	9,341	DL 28	71,051
8	DL 27	7,324	DL 4	9,340	DL 15	67,871
9	DL 28	7,323	DL 15	9,340	DL 4	66,989
10	DL 10	6,627	DL 18	9,339	DL 23	60,207
11	DL 9	6,624	DL 2	9,338	DL 11	56,451
12	DL 18	6,604	DL 20	9,337	DL 10	56,393
13	DL 17	6,603	DL 11	9,337	DL 18	56,257
14	DL 6	6,449	DL 9	9,337	DL 29	56,205
15	DL 15	6,445	DL 17	9,337	DL 14	55,387
16	DL 14	6,443	DL 23	9,336	DL 17	55,193
17	DL 29	6,280	DL 24	9,336	DL 13	53,676
18	DL 30	6,278	DL 6	9,336	DL 8	51,929
19	DL 11	6,134	DL 14	9,335	DL 9	51,202
20	DL 8	5,961	DL 8	9,334	DL 30	50,702
21	DL 13	5,258	DL 19	9,334	DL 6	49,419
22	DL 12	5,253	DL 25	9,333	DL 20	49,212
23	DL 20	5,118	DL 13	9,331	DL 12	46,806
24	DL 19	5,115	DL 10	9,330	DL 19	41,657
Média Geral		6,988		9,338		61,011

Como houve uma variação entre os resultados obtidos para valores genotípicos, uma alternativa de seleção seria a combinação de caracteres que estejam correlacionados. Tendo em vista que a seleção baseada em somente um ou poucos caracteres mostra-se inadequada, conduzindo a um produto final superior apenas em relação ao caráter selecionado (CRUZ e REGAZZI, 1997). Sendo assim,

poderia indicar as famílias DL 2, DL 3, DL 5, DL 14, DL 15, DL 24 e DL 25, possibilitando a maior probabilidade de ganho genético em relação ao porte da planta e número de botões florais por planta.

Dentro das famílias selecionadas poderia realizar a seleção de clones elites (seleção massal), pois de acordo com Kimbeng e Cox (2003) a união desses dois modos de seleção proporcionaria uma eficiência no melhoramento genético. Os clones elites selecionados poderiam ser multiplicados e colocados no mercado ou então, ser utilizados para direcionar futuros cruzamentos com o objetivo de gerar novas famílias para um novo ciclo seletivo, aumentando a probabilidade de encontrar genótipos superiores que poderiam ser clonados.

3.4 CONCLUSÕES

Estimativas de herdabilidade da média da família apresentaram-se superiores quando comparadas às estimativas de herdabilidade no sentido restrito individual para todos os caracteres avaliados.

Estimativas de herdabilidade de média de família de magnitude mediana a alta foram obtidas para os caracteres altura de planta (0,89), comprimento da folha (0,83), largura da folha (0,69), número de hastes (0,68) e número de botões florais por planta (0,67), indicando maior possibilidade de sucesso no melhoramento genético de *hemerocale*, mediante a seleção desses caracteres.

As correlações genéticas observadas indicam que pode ser efetuada seleção para os caracteres altura de planta e número de hastes visando o aumento do número de botões florais.

Como houve uma variação entre os resultados obtidos para valores genotípicos, uma alternativa de seleção seria a combinação de caracteres que estejam correlacionados. Sendo assim, poderia indicar as famílias DL 2, DL 3, DL 5, DL 14, DL 15, DL 24 e DL 25, possibilitando a maior probabilidade de ganho genético em relação ao porte da planta e número de botões florais por planta.

Foi possível selecionar famílias que apresentaram um ganho genético de 19,80% para altura de planta, 32,48% para número de hastes e 38,64% para número de botões florais por planta.

3.5 REFERÊNCIAS

- ALLARD, R. W. **Princípios do Melhoramento Genético de Plantas**. Tradução de Almiro Blumenschein et al. São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda. 1971, 381 p. Título original: Principles of Plant Breeding.
- ANDERSON, S. Floral variation in *Saxifraga granulata*: phenotypic selection, quantitative genetics and predicted response to selection. **Heredity**, v. 77, p. 217-223, 1996.
- BOREM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 4 ed. Viçosa: UFV, 2005. 525p.
- BROCK, R. D. Fertility in *Lilium* hybrids. **Heredity**, v. 8, p 409-420, 1954.
- ÇAMAS, N.; ESENDAL, E. Estimates of broad-sense heritability for seed yield and yield components of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **Hereditas**, v. 143, p.55-57, 2006.
- COSTA, R. B.; RESENDE, M. D. V.; ARAÚJO, A. J.; GONÇALVES, P. S.; HIGA, A. R. Selection and genetic gain in rubber tree (*Hevea*) populations using a mixed mating system. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 3, p. 671-679, 2000.
- COSTA, A. S. da.; LOGES, V.; CASTRO, A. C. R de.; BEZERRA, G. S. M.; SANTOS, V. F dos. Variabilidade genética e correlações entre caracteres de cultivares e híbridos de *Heliconia psittacorum*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, UFRPE: Recife, v. 2, n. 3, p. 187-192, 2007.
- CRUZ, C. D; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora, UFV, 1997. 390p.
- DE JONG, J.; GARRETSEN, F. Genetic analysis of flower and lateral shoot production in gerbera. **Euphytica**, v. 34, p. 785-791, 1985.
- DE JONG, J. Selection for Physiological Traits. In: HARDING, J.; SINGH, F.; MOL, J. N. M. (eds.). **Genetics and Breeding of Ornamental Species**. Boston: Kluwer Academic Publisher, p. 110-131, 1991.
- ERHARDT, W. **Hemerocalles Daylilies**. Portland, Oregon: Timber Press, 1992. 160p.

ERWIN, J. Factors affecting flowering in ornamental plant. In: ANDERSON, N.O. (ed.). **Flower Breeding and Genetics**. Netherlands, p. 7-48, 2006.

FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Trad. de Martinho de Almeida e Silva e José Carlos Silva. Viçosa, UFV. Impr. Univ. 1987. 279p.

FUNDAÇÃO PESQUISA E PLANEJAMENTO PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DE JOINVILLE. Disponível em: < <http://www.ippuj.sc.gov.br>> Acesso em: 20 de novembro de 2004.

GATLIN, F. L. **An illustrated Guide to Daylilies**. USA: American Hemerocallis Society, 1999. 100p.

GIBBS, P. E. Do homomorphic and heteromorphic selfincompatibility systems have the same sporophytic mechanism. **Plant Systematics and Evolution**, v.154, p.285-323, 1986.

GÓMEZ, K. A.; GÓMEZ, A. A. **Statistical procedures for agricultural research**. John Wiley. New York, 1984. 680p.

HARDING, J.; BYRNE, T. G.; NELSON, R. L. Estimation of heritability and response to selection for cut-flower yield in gerbera. **Euphytica**, v. 30, p. 313-322, 1981.

KIMBERG, A. C.; COX, M. C. Early generation selection of sugarcane families and clones in Australia: a review. **Journal American Society of Sugarcane Technologists**, v. 23, p. 20-39, 2003.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M de; **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa, São Paulo: Editora Plantarum, 2001. 734p.

JONG, J. de. Genetic analysis in *Chrysanthemum morifolium* L. flowering time and flower number at low and optimum temperature. **Euphytica**, v. 33, p. 455-463, 1984.

LEFFRING, L. Flower production in gerbera. I. Correlations between shoot, leaf and flower formation in seedlings. **Scientia Horticulturae**, v.1, p. 221-229, 1973.

NAU, J. **Ball perennial manual: propagation and production**. Batavia, Illinois: Ball Publishing. p. 254-258. 1995.

PETIT, T. L.; CALLAWAY, D. J. Breeding Daylilies (Hemerocallis). In: CALLAWAY, D. J.; CALLAWAY, M. B. (Ed.). **Breeding Ornamental Plants**. Portland, Oregon: Timber Press, p. 19 – 37, 2000.

POETHIC, R. S. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. **Science**, v. 250. p. 923-930, 1990.

RAM, G. BHAN, M. K.; GUPTA, K. K.; THAKER, B.; JAMWAL, U.; PAL, Variability pattern and correlation studies in *Silybum marianum* Gaertn. **Fitoterapia**, v. 76, p. 143-147. 2005.

RESENDE, M. D. V. de. **Análise estatística de modelos mistos via REML/BLUP na experimentação em melhoramento de plantas perenes**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 101 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 47).

RESENDE, M. D. V. **Genética Biométrica e Estatística no Melhoramento de Plantas Perenes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002a. 975p.

RESENDE, M. D. V. **Software SELEGEN – REML/BLUP**. Colombo: Embrapa Florestas, 2002b. 67p. (Embrapa Florestas. Documentos, 77).

RIESEBERG, L. H.; CARNEY, S. E. Tansley Review N.º 102: Plant hybridization. **New Phytologist**, v. 140, p. 599-624, 1998.

ROCHA, M. G. B.; PIRES, I. E.; ROCHA, R. B.; XAVIER, A.; CRUZ, C. D. Avaliação genética de progênies de meio-irmãos de *Eucalyptus grandis* por meio dos procedimentos REML/BLUP e da ANOVA. **Scientia Florestalis**, v. 71, p.99-107, 2006.

STOUT, A. B.; CHANDLER, C. Pollen-tube behavior in *Hemerocallis* with special reference to incompatibilities. **Bulletin of the Torrey Club**, v. 60, p. 397-417, 1933.

TOMBOLATO, A. F. C. Melhoramento Genético de Plantas Exóticas no Brasil. In: **Biológico**. São Paulo, v. 63, n. 1, p. 49-50, jan./dez., 2001.

TOMBOLATO, A. F. C. Hemerocallis – *Hemerocallis hybrida*. In: **Cultivo Comercial de Plantas Ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 176-211, 2004.

TOMKINS, J. P.; WOOD, T. C.; BARNES, L. S.; WESTMAN, A.; WING, R. A. Evaluation of genetic variation in the daylily (*Hemerocallis* spp) using AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 489-496, 2001.

TOMS, E. M.; CORNISH, M. A.; KEARSEY, M. J. Comparison of family and sib selection during selfing. **Heredity**, v.73, p, 635-641, 1994.

VEGIS, A. Dormancy in Higher Plants. **Annual Reviews Plant Physiology**, v. 15. p. 185-224. 1964.

YU, Y. **Correlation and selection responses of flowering time with other traits in the Davis population of gerbera**. MS Dissertation. University of California, Davis. 1989.

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York, J. Wiley, 1984. 505 p.

4 CAPÍTULO II
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE FAMÍLIAS DE HEMEROCALÉ

RESUMO

Hemerocallis x hybrida (Hort.) também chamada de hemerocale, é uma espécie perene e herbácea que vem sendo muito utilizada na ornamentação de jardins. Na busca de novos produtos para o paisagismo, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar e selecionar genótipos de hemerocale com base em caracteres morfológicos. Para isso foram realizadas avaliações em 24 famílias obtidas por autofecundações e cruzamentos recíprocos entre 13 cultivares americanas previamente selecionadas. Desse total, oito famílias foram descartadas de acordo com as características da flor, restando 15 famílias para serem avaliadas. A avaliação das famílias foi efetuada mediante avaliação de caracteres morfológicos, sendo um total de cinco caracteres quantitativos e 10 caracteres qualitativos. Dentre as famílias avaliadas foi possível selecionar como bons materiais para serem utilizados em paisagismo as famílias DL 2, DL 3, DL 4, DL 5, DL 6, DL 14, DL 15 e DL 28, as quais apresentaram porte médio, número de hastes florais alto e valor mediano de número de botões florais, coloração atrativa das flores e folhas.

Palavras-chaves: *Hemerocallis X hybrida* Hort., planta ornamental, melhoramento genético, caracteres morfológicos.

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF DAYLILIES'S FAMILIES

ABSTRACT

Hemerocallis x hybrida (Hort.), commonly called daylily is a herbaceous perennial. They are very popular as garden plants. Looking for new products for landscape, the specific aim of this study was to characterize and to select plants of daylilies according to their morphological characters. For this, evaluations were made in 24 daylily hybrids obtained by self-and cross-pollinations. From all 24 eighth families, were eliminated due to flower characteristics with 15 families selected for evaluation. The morphological characters evaluated included: five quantitative characters and ten qualitative characters. Eight families were successfully selected for use in landscape: DL 2, DL 3, DL 4, DL 5, DL 6, DL 14, DL 15 e DL 28. These families presented medium length, high stem number, medium number of floral buds, flowers and leaves with attractive color.

Key-words: *Hemerocallis X Hybrida* Hort., ornamental plants, breeding, morphological characters.

4.1 INTRODUÇÃO

Hemerocallis x hybrida (Hort.), também conhecida como lírio-de-são-josé e hemerocale é uma espécie monocotiledônea, perene, herbácea da família Hemerocalidaceae (ERHARDT, 1992; PETIT e CALLAWAY, 2000). Essa espécie é adaptada a diferentes tipos de solo e clima. Suas flores podem ter de 5 a 20 centímetros de diâmetro e apresentar diferentes formas e cores (PETIT e PEAT, 2000; TOMBOLATO, 2004). Com relação às formas, podem se encontrar circulares, triangulares, dobradas, polipétalas, estreladas, “spiders” (aranhas), achatadas, trompetes, entre outros detalhes, como linha média, nervuras e bordas. Já as cores naturais das flores são: amarelo, laranja, vermelho com suas variações (NAU, 1995; GATLIN, 1999).

Cultivares de hemerocale apresentam grande variabilidade morfológica, em função do intenso melhoramento realizado nessa espécie. Melhoristas têm buscado em seus programas, melhorar propriedades estéticas (coloração e morfologia da flor), arquitetônicas (simetria da flor, estrutura da inflorescência) e características econômicas como produtividade (número de hastes florais e número de botões florais) e resistência a pragas e doenças (TOMBOLATO, 2004).

Para o hemerocale, uma espécie ornamental muito indicada para o paisagismo devido a sua rusticidade, os caracteres de importância para a seleção são: o número de escapo floral, o número de flores por escapo floral, a adaptação e algumas características importantes relacionadas com resistência a patógenos e qualidade do produto, como tamanho e tonalidade da flor (CALLAWAY e CALLAWAY, 2000; TOMBOLATO, 2001).

A caracterização de cultivares é uma etapa essencial em programas de certificação, melhoramento e conservação de germoplasma, por permitir o monitoramento da qualidade genética (TANKSLEY, 1983). Pode ser realizado com base em diferenças na morfologia de plantas, nas moléculas de proteínas e de DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998), em características citogenéticas e agronômicas, etc.

A caracterização morfológica possibilita indicar genótipos que apresentem potencial para utilização de programas de melhoramento genético ou para uso direto

por parte dos produtores, já que a produção de novas cultivares é fundamental para fortalecer o mercado de plantas ornamentais.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar e selecionar genótipos de *hemerocallis* com base em caracteres morfológicos, visando produzir informações que auxiliem a gerar novas cultivares.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 LOCAL DA PESQUISA

A empresa Agrícola da Ilha está localizada no município de Joinville, SC, situada nas coordenadas cartográficas de 26°18'16" latitude sul, 48°50'44" longitude oeste, na altitude entre 0 e 4,5 m acima do nível do mar. O clima é classificado como mesotérmico úmido, temperatura média anual 22,11 °C, sendo a média das máximas 30,6 °C e a média das mínimas 13,7 °C, com precipitação média mensal 136,22 mm e umidade relativa do ar 82,4% (Fundação Pesquisa e Planejamento para o Desenvolvimento Sustentável de Joinville, 2004).

4.2.2 MATERIAL VEGETAL

Famílias de hemerocale utilizadas neste trabalho foram originadas de cruzamentos recíprocos e auto-fecundações entre 13 cultivares americanas de hemerocale realizados durante o ano de 2004 na empresa Agrícola da Ilha, Ltda (Tabelas 8 e 9).

4.2.2.1 Transplante das plantas

Após a emergência das plântulas, período aproximado de 60 dias, as mudas foram transplantadas para canteiros com 1 m de largura e 52 m de comprimento, espaçadas de 30 x 40 cm. O solo foi primeiramente arado e em seguida aplicado adubo orgânico (3 kg.m⁻² de esterco de galinha curtido) + 100 gr.m⁻² de adubo químico NPK na formulação 10-10-10 em sulcos longitudinais. As plantas receberam irrigação manual durante um mês, com auxílio de regador. Após esse período as plantas não foram mais irrigadas.

Após um mês de transplante foi espalhado serragem nos canteiros experimentais, para manter a umidade do solo e também proteger da invasão de plantas daninhas.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos incompletos com 24 tratamentos (quatro autofecundações e 20 cruzamentos), com uma a quatro repetições e número variável de 4 a 10 plantas por parcela. O número de repetições

e de plantas por parcela variou devido ao baixo número de sementes produzidas e conseqüentemente de mudas obtidas.

4.2.2.2 Manutenção dos canteiros

Durante três anos foram realizadas duas podas foliares anuais: a primeira foi feita após o florescimento, em março, e a segunda em julho. As folhas foram cortadas deixando aproximadamente 10 cm de parte aérea. Em seguida aplicou-se adubo orgânico (3 kg.m^{-2} de esterco de galinha curtido) + 100 gr.m^{-2} de adubo químico NPK em sulcos na formulação 10-10-10 após a primeira poda e 4-14-8 na segunda poda.

Durante todo o período da pesquisa, mensalmente, foi realizada a retirada manual das plantas daninhas dos canteiros.

TABELA 8 - Características das cultivares de hemerocale utilizadas nas hibridações quanto ao porte da planta (P), número de botões por haste (NBH), cor da flor (CF) e formato de flor (FF). Joinville, SC, 2004.






NI	Cultivar	P ⁽¹⁾ cm	NBH ⁽²⁾	CF	FF	
50	'Caribbean Snowcap'	80,0	11,33	Branca	Triangular	
51	'Gentle Shepherd'	67,0	18,75	Branca	Triangular	
54	'Stolen Treasure'	41,0	9,5	Vermelha	Estrelada	
56	'Sugar Candy'	56,0	6,4	Rosa	Circular	
61	'Siloam Nugget'	42,0	6,2	Laranja	Circular	

TABELA 8 - Características das cultivares de hemerocale utilizadas nas hibridações quanto ao porte da planta (P), número de botões por haste (NBH), cor da flor (CF) e formato de flor (FF). Joinville, SC, 2004. (continuação)









NI	Cultivar	P ⁽¹⁾ cm	NBH ⁽²⁾	CF	FF	
65	'Cinderella's Dark Side'	52,0	12,75	Violeta	Circular	
66	'Siloam June Bug'	68,0	13,8	Amarela	Circular	
70	'Dragons Eye'	61,0	11,8	Rosa	Triangular	
72	'Siloam Show Girl'	73,0	22,2	Vermelha	Circular	
76	'Double Cranberry Ruffles'	68,0	14,16	Vermelha	Dobrada	

TABELA 8 - Características das cultivares de hemerocale utilizadas nas hibridações quanto ao porte da planta (P), número de botões por haste (NBH), cor da flor (CF) e formato de flor (FF). Joinville, SC, 2004. (continuação)

NI	Cultivar	P ⁽¹⁾ cm	NBH ⁽²⁾	CF	FF	
80	'Green Spider'	85,0	11,8	Amarela	Aranha	
82	'Cleopatra'	119,0	15,5	Rosa salmão	Aranha	
526	'Snowing Down South'	76,0	13,5	Branca	Triangular	

(1) Alto acima de 80 cm; Médio de 60 a 80 cm; Baixo de 35 a 60 cm.

(2) Alto acima de 15 botões/haste; Médio de 8 a 15 botões/haste; Baixo inferior a 8 botões/haste.

- NI – número de identificação dos parentais de acordo com os registros da Agrícola da Ilha, Ltda.

TABELA 9 - Cruzamentos efetuados entre cultivares americanas de hemerocale. Joinville, SC, 2004.

Número do cruzamento	Cruzamentos efetuados em relação ao	Característica dos parentais	Número de identificação dos parentais
DL 2	Porte	Médio X Alto	66 X 82
DL 3	Porte	Alto X Médio	82 X 66
DL 4	Porte	Baixo X Alto	56 X 82
DL 5	Porte	Alto X Baixo	82 X 56
DL 6	Porte	Médio X Médio	526 X 526
DL 8	Porte	Médio X Baixo	526 X 65
DL 10	Porte	Médio X Alto	526 X 50
DL 12	Porte	Médio X Baixo	51 X 54
DL 13	Porte	Baixo X Médio	54 X 51
DL 14	Porte	Alto X Baixo	80 X 54
DL 15	Porte	Baixo X Alto	54 X 80
DL 24	Número de botões florais	Alto X Médio	76 X 70
DL 28	Número de botões florais	Baixo X Médio	56 X 526
DL 29	Número de botões florais	Alto X Baixo	51 X 56
DL 30	Número de botões florais	Baixo X Alto	56 X 51

4.2.3 CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DAS FAMÍLIAS

As avaliações foram realizadas em condições de campo. Durante todo o período reprodutivo (novembro-março) do terceiro ano após as hibridizações, avaliações diárias foram feitas para a caracterização do material plantado utilizando descritores morfológicos de hemerocale² (Tabela 10).

² Este descritor foi baseado em uma proposta elaborada pelo IAC e encontra-se em análise no SNPC.

TABELA 10 - Tabela de descritores de hemerocale (*Hemerocallis X hybrida* Hort.) com alterações. Joinville, SC, 2007.

Característica	Identificação da característica	Código de cada descrição
Altura	Baixa – 35 a 60 cm	1
	Média – 60 a 80 cm	2
	Alta – acima de 80 cm	3
Largura da Folha	Estreita – até 2 cm	1
	Média – 2 a 3 cm	2
	Larga – acima de 3 cm	3
Forma da folha	Linear	1
	Estreito-elíptica	2
	Elíptica	3
Forma da seção transversal da base da folha	Plana	1
	Forma V	2
Forma do ápice da folha	Reto	1
	Recurvado	2
Tonalidade da coloração verde da folha	Clara	1
	Médio	2
	Escuro	3
	Azulado	4
Variação	Ausente	1
	Presente	2
Número de haste	Baixo – inferior de 3	1
	Médio – 3 a 8	2
	Alto – acima de 8	3
Número de botões/haste	Baixo – inferior a 8	1
	Médio – 8 a 15	2
	Alto – acima de 15	3
Tipo de flor	Trombeta	1
	Circular	2
	Triangular	3
	Estrelada	4
	Plana	5
	Aranha	6
Cor da Flor	Branco	1
	Rosa claro	2
	Amarelo esverdeado	3
	Amarelo	4
	Laranja amarelado	5
	Laranja	6
	Lilás	7
	Rosa	8
	Rosa Pink	9
	Rosa púrpura	10
	Rosa violeta	11
	Vermelho	12
	Violeta	13
	Bordo	14

Diâmetro da flor	Pequeno – menor que 5 cm	1
	Médio – de 5 a 10 cm	2
	Grande – maior que 10 cm	3
Zona de olho	Ausente	1
	Presente	2
Coloração do olho	Claro	1
	Escuro	2
Coloração da garganta	Amarelo	1
	Verde	2
	Laranja	3
	Rosa	4

A avaliação das características morfológicas foi realizada após três anos do transplante das mudas para o campo. As características foram: altura de plantas; comprimento e largura da folha, número de haste por planta, número de botões florais por haste e número de botões florais por planta.

A altura da planta foi medida em centímetros, com uma trena graduada desde o nível do solo, junto à planta, até a extremidade da haste. Para o comprimento e largura das folhas também foi utilizada uma trena graduada. O comprimento da folha foi medido desde a coroa até a extremidade da folha e a largura foi medida na região mediana da folha. A contagem do número de hastes, número de botões florais por haste e número de botões florais por planta foi feita na mesma ocasião e nas mesmas plantas utilizadas para a avaliação dos caracteres anteriormente citados.

As características qualitativas avaliadas foram: cor e forma da folha, variação, tipo de flor, cor de pétala, sépala, garganta e olho. Estas características foram avaliadas mediante observações visuais, conforme descrito na tabela 10.

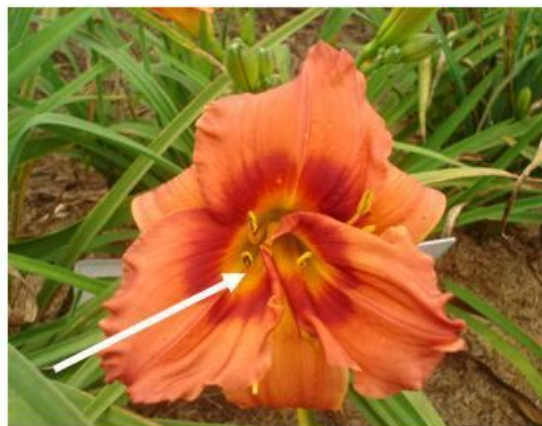
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 SELEÇÃO DAS FAMÍLIAS

Das famílias obtidas, 15 que apresentaram flores sem deformações foram selecionadas para serem apresentadas suas características morfológicas. A família (DL 11) foi descartada por ter florescido antes do período de avaliação, não sendo possível avaliar as características das flores. Oito famílias (DL 9, DL 17, DL18, DL 19, DL 20, DL 23, DL 25 e DL 27) foram descartadas devido à deformação das pétalas (flores com formato não definido) ou por apresentarem flores sem estames conforme pode ser observado na Figura 5.



Família DL 18



Família DL 19

FIGURA 5 – Famílias de hemerocale descartadas baseado nas características das flores. Joinville, SC, 2007.

4.3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS FAMÍLIAS SELECIONADAS

Os dados das famílias selecionadas foram plotados em gráficos a fim de demonstrar o seu comportamento em relação a características morfológicas (Anexos 1, 2 e 3). A partir desses gráficos as famílias foram caracterizadas.

As famílias selecionadas apresentaram variabilidade não só na coloração das flores como também no tipo de flor. De acordo com Petit e Callaway (2000) cultivares de hemerocale podem ser agrupadas de acordo com o tamanho ou o tipo

de flor. No presente trabalho, as famílias selecionadas foram divididas em grupos, definidos pelo tipo de flor, estrelada, aranha, triangular e circular (Tabela 11).

As famílias avaliadas apresentam as seguintes características:

Grupo I - Tipo de flor estrelada

Famílias DL 2 e DL 3

Plantas da família DL2 apresentaram porte mediano (de 60 a 80 cm), e plantas da família DL 3 porte alto (acima de 80 cm), para as demais características os híbridos foram semelhantes. Folhas lineares, estreitas e de coloração verde médio, variação ausente, forma V e ápice da folha reta, com valor alto de número de hastes (acima de 8 hastes) e valor médio de número de botões florais (8 a 15 botões florais por haste), com flores de formato estrelada de diâmetro médio (de 5 a 10 cm), com coloração laranja. As flores apresentaram presença de olho com coloração vermelho escuro, e a região nectanífera (também chamada de garganta) de coloração laranja.

Grupo II - Tipo de flor aranha

Famílias DL 4 e DL 5

Plantas com porte mediano (de 60 a 80 cm), com folhas lineares, estreitas e de coloração verde médio, variação ausente, forma V e ápice da folha reta, com valor médio de número de hastes (3 a 8 hastes) e valor médio de número de botões florais (8 a 15 botões florais por haste), com flores de formato aranha de diâmetro médio (de 5 a 10 cm), com coloração rosa, o olho de coloração escura e região nectanífera de coloração laranja.

Famílias DL 14 e DL 15

Plantas com porte mediano (de 60 a 80 cm), com folhas lineares, estreitas e de coloração verde médio, variação ausente, forma V e ápice da folha reta, com valor alto de número de hastes (acima de 8 hastes) para família DL 15 e baixo (inferior a 8 hastes) para família DL 14, valor médio de número de botões florais (8 a 15 botões florais por haste), com flores de formato aranha de diâmetro grande (maior que 10 cm) de cor vermelha, olho ausente, e região nectanífera de coloração verde.

Grupo III – Tipo de Flor Triangular

Família DL 6

Plantas com porte mediano (de 60 a 80 cm), com folhas lineares, de largura mediana e de coloração verde médio, variação ausente, forma V e ápice da folha reta, com valor alto de número de hastes (acima de 8 hastes) e valor médio de número de botões florais (8 a 15 botões florais por haste), com flores de formato triangular de diâmetro médio (de 5 a 10 cm) e coloração amarela clara, olho ausente e região nectanífera verde.

Família DL 8

Plantas com porte baixo (de 35 a 60 cm), com folhas lineares, largura mediana e de coloração verde médio, variação ausente, forma V e ápice da folha reta, com valor médio de número de hastes (3 a 8 hastes) e valor médio de número de botões florais (8 a 15 botões florais por haste), com flores de formato triangular de diâmetro médio (de 5 a 10 cm) e coloração rosa púrpura, olho ausente e região nectanífera de coloração verde.

Família DL 10

Plantas com porte baixo (de 35 a 60 cm), com folhas lineares, de largura mediana e de coloração verde médio, variação ausente, forma V e ápice da folha reta, com valor médio de número de hastes (3 a 8 hastes) e valor médio de número de botões florais (8 a 15 botões florais por haste), flores de formato triangular de diâmetro médio (de 5 a 10 cm) e coloração branca, olho ausente e região nectanífera verde.

Família DL 12

Plantas com porte mediano (de 60 a 80 cm), com folhas lineares, largura mediana e de coloração verde médio, variação ausente, forma V e ápice da folha reta, com valor médio de número de hastes (3 a 8 hastes) e valor baixo de número de botões florais (inferior a 8 botões florais por haste), com flores de formato triangular de diâmetro médio (de 5 a 10 cm) e coloração rosa “pink”, olho ausente e a região nectanífera de coloração verde.

Família DL 24

Plantas com porte baixo (de 35 a 60 cm), com folhas lineares, largura mediana e de coloração verde claro, variação ausente, forma V e ápice da folha reta, com valor alto de número de hastes (acima de 8 hastes) e valor médio de número de botões florais (8 a 15 botões florais por haste), com flores de formato triangular de diâmetro médio (de 5 a 10 cm) e coloração vermelha, olho presente, de coloração vermelho escuro e região nectanífera de coloração verde.

Família DL 29

Plantas com porte baixo (de 35 a 60 cm), com folhas lineares, estreita e de coloração verde claro, variação ausente, forma V e ápice da folha reta, com valor médio de número de hastes (3 a 8 hastes) e valor baixo de número de botões florais (inferior a 8 botões florais por haste), com flores de formato triangular de diâmetro médio (de 5 a 10 cm) e coloração rosa claro, olho ausente e região nectanífera de coloração verde.

Família DL 30

Plantas com porte baixo (de 35 a 60 cm), com folhas lineares, de largura mediana e de coloração verde médio, variação ausente, forma V e ápice da folha reta, com valor médio de número de hastes (3 a 8 hastes) e valor baixo de número de botões florais (inferior a 8 botões), flores de formato triangular de diâmetro médio (de 5 a 10 cm) e coloração amarelo claro, olho ausente e região nectanífera verde.

Grupo IV – Tipo de Flor Circular

Família DL 13

Plantas com porte baixo (de 35 a 60 cm), com folhas lineares, largura mediana e de coloração verde médio, variação ausente, forma V e ápice da folha reta, com valor médio de número de hastes (3 a 8 hastes) e valor baixo de número de botões florais (inferior a 8 botões florais por haste), com flores de formato circular e coloração branca, diâmetro médio (de 5 a 10 cm), olho ausente e região nectanífera de coloração verde.

Família DL 28

Plantas com porte mediano (de 60 a 80 cm), com folhas lineares, estreita e de coloração verde claro, variação ausente, forma V e ápice da folha reta, com valor alto de número de hastes (acima de 8 hastes) e valor médio de número de botões florais (8 a 15 botões florais por haste), com flores de formato circular de diâmetro médio (de 5 a 10 cm) e coloração rosa avermelhado, olho presente de coloração vermelho escuro e região nectanífera de coloração verde.

Para as famílias selecionadas foi observado que algumas características morfológicas dos parentais predominaram nas progênes obtidas. Uma característica que é bastante peculiar e apresentou esse resultado foi o olho, área escura localizada no centro da flor, que contrasta com o restante da cor das pétalas (PETIT e CALLAWAY, 2000). As famílias DL 2, DL 3, DL 4, DL 5 e DL 24, as quais utilizaram como um dos parentais uma cultivar que têm a presença do olho, apresentaram essa característica na maioria dos híbridos produzidos (Tabela 11, Anexo 3).

Outra característica que apresentou comportamento semelhante foi o formato da flor, verificou-se que para o formato aranha nas famílias DL 4 e DL 5, as quais utilizaram a cultivar 'Cleopatra' como um dos parentais e as famílias DL 14 e DL 15 que utilizaram a cultivar 'Green Spider' a maioria dos híbridos apresentaram esse formato (Anexo 2). Estas famílias permitiram observar que independente da posição que as cultivares ocuparam nos cruzamentos direcionados (doador ou receptor de pólen), a resposta predominante para o formato de flor foi o mesmo, ou seja, aranha. Resultado similar foi observado para o formato triangular. As famílias DL 6, DL 8, DL 10, DL 12, DL 24, DL 29 e DL 30, as quais utilizaram pelo menos um dos parentais com formato triangular, resultou na maioria dos híbridos com flores de formato semelhante (Anexo 2).

Para a característica cor da flor, as progênes apresentaram coloração intermediária em relação aos parentais, portanto, houve um efeito de codominância (CALLAWAY e CALLAWAY, 2000).

Ainda com relação à coloração da flor, Petit e Callaway (2000) citam que a busca de hibridizadores é a obtenção do *hemerocale* branco. Segundo os mesmos autores a cultivar 'Gentle Sherpherd' é um bom parental para obtenção de híbridos de cor branca, pois apresenta flavonóides (pigmentos que possui pouca coloração),

e, ao cruzá-la com cultivares que apresentam pigmentos amarelo, vermelho ou laranja, esses são neutralizados pelos flavonóides, resultando em flores de coloração branca ou creme. Este efeito foi observado no presente trabalho, entretanto, vale ressaltar que esse resultado dependeu da posição que a cultivar ocupou na hibridização. Pois ao verificar as famílias DL 13 (54 x 51) e DL 30 (56 x 51), as quais utilizaram a cultivar 'G. Sherpherd' como doadora de pólen, apresentaram flores de coloração creme. Em contrapartida, as famílias DL 12 (51 x 54) e DL 29 (51 x 56), as quais utilizaram a cultivar 'G. Sherpherd' como receptora de pólen, o resultado foi diferente, as flores apresentaram coloração rosa "pink" e rosa claro, respectivamente (Tabela 11). Esse resultado permite inferir que plantas com flores de coloração creme ou branca serão obtidas ao utilizar 'Gentle Sherpherd' como doadora de pólen.

Dentre as famílias avaliadas foi possível selecionar como bons materiais para serem utilizados no paisagismo as seguintes famílias: DL 2, DL 3, DL 4, DL 5, DL 6, DL 14, DL 15 e DL 28. Contudo, para a obtenção de genótipos superiores, é necessária a reunião de uma série de atributos favoráveis que confirmem rendimento comparativamente mais elevado e satisfaçam as exigências do mercado (CRUZ e REGAZZI, 1997). Ao comparar o resultado da seleção de famílias realizada de acordo com as características morfológicas, com a seleção realizada em função das características quantitativas (dados não apresentados), verifica-se que cinco famílias (DL 2, DL 3, DL 5, DL 14 e DL 15) corroboraram. A seleção dessas famílias além de permitir o uso de plantas com características paisagísticas desejáveis, proporcionaria um ganho genético para os caracteres altura de planta, número de hastes e número de botões florais por planta.

TABELA 11 - Fotos e caracterização de flores de famílias de hemerocale com potencial ornamental. Joinville, SC, 2007.




Famílias Selecionadas	Grupo	Características	Foto
DL 2 e DL 3	I	Tipo de flor: estrelada Cor da flor: laranja Região do Olho: presente Coloração da garganta: verde	
DL 4 e DL 5	II	Tipo de flor: aranha Cor da flor: rosa Região do Olho: presente Coloração da garganta: laranja	
DL 14 e DL 15	II	Tipo de flor: aranha Cor da flor: vermelha Região do Olho: ausente Coloração da garganta: verde	

TABELA 11 - Fotos e caracterização de flores de famílias de hemerocale com potencial ornamental. Joinville, SC, 2007.
(continuação).




Famílias Selecionadas	Grupo	Características	Foto
DL 6	III	Tipo de flor: triangular Cor da flor: amarelo claro Região do Olho: ausente Coloração da garganta: verde	
DL 8	III	Tipo de flor: triangular Cor da flor: rosa púrpura Região do Olho: ausente Coloração da garganta: verde	
DL 10	III	Tipo de flor: triangular Cor da flor: branca Região do Olho: ausente Coloração da garganta: verde	

TABELA 11 - Fotos e caracterização de flores de famílias de hemerocale com potencial ornamental. Joinville, SC, 2007.
(continuação).





Famílias Selecionadas	Grupo	Características	Foto
DL 12	III	Tipo de flor: triangular Cor da flor: rosa pink Região do Olho: ausente Coloração da garganta: verde	
DL 24	III	Tipo de flor: triangular Cor da flor: vermelha Região do Olho: presente Coloração da garganta: verde	
DL 29	II	Tipo de flor: triangular Cor da flor: rosa claro Região do Olho: ausente Coloração da garganta: verde	

TABELA 11 - Fotos e caracterização de flores de famílias de hemerocale com potencial ornamental. Joinville, SC, 2007.
(continuação).

Famílias Selecionadas	Grupo	Características	Foto
DL 30	III	Tipo de flor: Triangular Cor da flor: branca Região do Olho: ausente Coloração da garganta: verde	
DL 13	IV	Tipo de flor: Circular Cor da flor: branca Região do Olho: ausente Coloração da garganta: verde	
DL 28	IV	Tipo de flor: Circular Cor da flor: rosa avermelhada Região do Olho: presente Coloração da garganta: verde	

4.4 CONCLUSÕES

Das 24 famílias avaliadas, oito famílias foram descartadas de acordo com as características da flor.

Dentre as famílias avaliadas foi possível selecionar como bons genótipos para serem utilizados em paisagismo as famílias DL 2, DL 3, DL D4, DL 5, DL 6, DL 14, DL 15 e DL 28, as quais apresentaram porte médio, número de hastes florais alto e valor mediano de número de botões florais, coloração atrativa das flores e folhas.

Das famílias selecionadas, cinco (DL 2, DL 3, DL 5, DL 14 e DL 15) corroboraram com a seleção feita em função das características quantitativas.

4.5 REFERÊNCIAS

- CALLAWAY, M. B.; CALLAWAY, D. J. Genetics and its applications. In: CALLAWAY, D. J.; CALLAWAY, M. B. (Ed.). **Breeding Ornamental Plants**. Portland, Oregon: Timber Press, p. 19 – 37, 2000.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora, UFV, 1997. 390p.
- ERHARDT, W. **Hemerocallis Daylilies**. Portland, Oregon: Timber Press, 1992, 160p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.
- FUNDAÇÃO PESQUISA E PLANEJAMENTO PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DE JOINVILLE. Disponível em: < <http://www.ippuj.sc.gov.br> > Acesso em: 20 de novembro de 2004.
- GATLIN, F. L. **An illustrated Guide to Daylilies**. USA: American Hemerocallis Society, 1999. 100p.
- NAU, J. **Ball perennial manual: propagation and production**. Batavia, Illinois: Ball Publishing. p. 254-258, 1995.
- PETIT, T. L.; CALLAWAY, D. J. Breeding Daylilies (*Hemerocallis hybrida*). In: CALLAWAY, D. J.; CALLAWAY, M. B. (Ed.). **Breeding Ornamental Plants**. Portland, Oregon: Timber Press, p. 19 – 37, 2000.
- PETIT, T. L.; PEAT, J. P. **The Color Encyclopedia of Daylilies**. Portland, Oregon: Timber Press, 2000. 300p.
- TANKSLEY, S. Molecular markers in plant breeding. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, p. 3-8, 1983.
- TOMBOLATO, A. F. C. Melhoramento Genético de Plantas Exóticas no Brasil. In: **Biológico**. São Paulo, v. 63, n. 1, p. 49-50, jan./dez., 2001.

TOMBOLATO, A. F. C. Hemerocale – *Hemerocallis hybrida*. In: **Cultivo Comercial de Plantas Ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 176-211, 2004.

5 CAPÍTULO III
DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA EM CULTIVARES DE HEMEROCALIS

RESUMO

Em cruzamentos realizados entre treze cultivares de *hemerocale*, nem todas as plantas produziram frutos, e/ou quando isso ocorria havia formação de um número baixo de sementes. É possível supor que os genitores classificados como diplóides não o fossem, e a diferença no nível de ploidia possa ter causado barreiras nas hibridizações. O presente trabalho teve como objetivo adequar uma metodologia para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas, quantificar e confirmar o nível de ploidia de 13 cultivares de *hemerocale* supostamente diplóides. Dentre os seis tratamentos testados, a metodologia utilizada por Pinares (2001) com algumas modificações foi a que apresentou cromossomos com morfologia nítida. A análise de quantificação revelou que o número de cromossomos variou de 20 a 24 nas células de algumas cultivares. No entanto, a maioria das cultivares analisadas apresentou número cromossômico diplóide ($2n = 22$), confirmando-se assim sua ploidia. Este resultado indica que o nível de ploidia não foi responsável pela não formação de sementes de *hemerocale* entre genótipos testados.

Palavras-chaves: *Hemerocallis X hybrida* Hort., planta ornamental, contagem de cromossomos, citogenética.

DETERMINATION OF PLOIDY LEVEL OF DAYLILIES'S CULTIVARS

ABSTRACT

Crosses were performed among 13 daylilies cultivars. Some crosses did not produce seeds or seed production was low. It is likely that parents classified as diploids were not diploids, and the ploidy level may have contributed to failure in hybridizations. The present study aimed at developing an efficient protocol for cytological analyses of daylily cultivars using chromosome counting such analyses should assist in qualifying and confirming ploidy levels in daylily cultivars. The chromosome counting analysis was performed following the protocol used by Pinares (2001) with some modifications. Chromosome counting analysis revealed that the ploidy ranged from 20 to 24. However, most cultivars analyzed showed a diploid chromosome number ($2n = 22$). This result indicates that the ploidy level did not affect seed formation.

Key-words: *Hemerocallis X hybrida* Hort., ornamental plant, microscopic counting analysis, cytogenetic.

5.1 INTRODUÇÃO

O melhoramento de *hemerocale*, também conhecido como lírio-de-são-josé, envolve o cruzamento de genótipos com variabilidade genética seguidos por uma seleção em relação à beleza da flor e ao fenótipo da planta (TOMKINS *et al.*, 2001). Aproximadamente 52.000 cultivares estão catalogadas na “The American Hemerocallis Society” (AHS) (TOMBOLATO, 2004), as quais podem ser diplóides ($2n=22$), triplóides, as quais são estéreis, e tetraplóides que são o resultado da duplicação do número básico de cromossomos realizado por melhoristas via uso de tratamento com colchicina (TOMKINS *et al.*, 2001).

Embora o melhoramento dessa espécie venha sendo desenvolvido extensivamente, poucos estudos citogenéticos foram feitos (BRENNAN, 1992). Para que um programa de melhoramento tenha sucesso, um “screening” da ploidia de parentais é requerido antes da polinização, para favorecer a escolha da melhor estratégia de cruzamentos (DE SCHEPPER *et al.*, 2001 e SAITO *et al.*, 2003). Isto foi demonstrado para espécies de *Rhododendron*, que foram selecionadas como híbridos interespecíficos para o programa de melhoramento de azaléias com o objetivo de obter novas colorações de pétalas (EECKHAUT *et al.*, 2003).

Nos cruzamentos realizados entre treze cultivares de *hemerocale*, apresentadas no capítulo I, nem todas as plantas produziram frutos, e/ou quando isso ocorria não havia formação de sementes. É possível supor que os genitores classificados como diplóides não o fossem. De acordo com Sakhanokho e Pounders (2006) a diferença no nível de ploidia pode causar sérias barreiras para a hibridização. Corroborando com esses autores, Petit e Peat (2000) também citam que em cruzamentos de plantas com diferentes ploidias o fruto pode se desenvolver inicialmente, mas após algumas semanas ele seca e aborta.

Várias estratégias estão disponíveis para a confirmação do nível de ploidia, dentre elas a metodologia mais utilizada é a técnica de contagem de cromossomos convencional. Para poder realizar este estudo é necessário selecionar o tecido meristemático idôneo da espécie vegetal, e assim poder visualizar células em divisão mitótica. Em geral são utilizados ápices de raízes, folhas, calos obtidos *in vitro* entre

outros (MARTIN, 2003). Uma vez escolhido o meristema inicia-se a fase mais complexa (o pré-tratamento) na obtenção de preparações cromossômicas, principalmente quando o objetivo é obter metáfases mitóticas de alta qualidade, ou seja, com todos os cromossomos espalhados e com sua morfologia nítida (MONDIN e DOCHA NETO, 2006).

O pré-tratamento tem como objetivo a interrupção do ciclo celular, a qual deve ocorrer antes que as fibras do fuso separem as cromátides irmãs de tal forma que além de permanecerem em metáfase, os cromossomos possam espalhar quando for realizada a preparação da lâmina sendo possível a observação e a contagem dos mesmos. Vários tratamentos utilizando inibidores do fuso mitótico para acúmulo de metáfases têm sido descrito em plantas. Para cultivares de *hemerocale* Saito *et al.* (2003) e Lovatto e Battistin (1997) obtiveram metáfases em pré-tratamento, o qual não utilizou nenhum agente inibidor. O pré-tratamento consistiu somente de imersão de pontas de raízes em água destilada sob baixa temperatura, diferentemente do estudo realizado por Krikorian *et al.* (1981), no qual foi utilizado como agente inibidor a solução de 1-bromonaftaleno (0,05%).

Em estudo citogenético convencional de *hemerocale* conduzido por Zadoo *et al.* (1975), no qual foi utilizado ápices de raízes, o número cromossômico de 27 espécies e oito cultivares de *hemerocale* foram determinados. Esses autores relataram que todos os cariótipos apresentaram $2n = 2x = 22$ cromossomos, apenas alguns clones apresentaram $2n = 23, 24, 32, 33$ e 34 cromossomos. Os mesmos autores mencionaram que $x = 11$ em *hemerocale* é uma exceção na família das Liliáceas e acreditam que $x = 11$ derivou-se de um número menor, como 6 ou 5 e que esses cromossomos foram duplicados originando o número básico $x = 11$.

O presente trabalho teve como objetivos adequar uma metodologia para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas, quantificar e confirmar o nível de ploidia de 13 cultivares de *hemerocale*, e, verificar se o nível de ploidia foi responsável pela não formação de sementes nos cruzamentos direcionados.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 CULTIVO DAS PLANTAS

Treze cultivares de *hemerocale* (Tabela 12) supostamente diplóides foram cultivadas em vasos de polietileno com diâmetro de 25 cm e capacidade para 12 L de substrato (Fafard Growing Mix®), em ambiente aberto, sem restrição hídrica, no Departamento de Horticultura Ambiental, da Universidade da Flórida (UF-IFAS-TREC), localizado em Homestead, Flórida, USA.

5.2.2 ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE CITOGENÉTICA

A análise citogenética convencional foi realizada no Laboratório de Horticultura Ornamental do Departamento de Horticultura Ambiental, da Universidade da Flórida (UF-IFAS-TREC), localizado em Homestead, Flórida, USA.

Para determinar a metodologia mais adequada para a contagem do número de cromossomos, ou seja, preparações com alta frequência de metáfases apresentando cromossomos com morfologia nítida, foram testados seis tratamentos, com duas repetições. Cada repetição foi composta por um vaso com o clone da planta-mãe. Os tratamentos foram baseados nas metodologias para a caracterização citogenética de coleções de ornamentais (PINARES, 2001), de cultivares de *hemerocale* (SAITO *et al.*, 2003) e de espécies da ordem Liliales *in vitro* (LOVATTO e BATTISTIN, 1997) (Tabela 13). Em todos os tratamentos foram realizadas modificações durante a fase de coloração conforme pode ser verificado na Tabela 13.

Folhas e raízes de *hemerocale* de cada cultivar foram cortadas para estimular o crescimento e a formação de novas raízes. Passado três dias, raízes de aproximadamente 2 cm foram coletadas (Figura 6).

Após a realização dos tratamentos (Tabela 13, Figura 6), os ápices corados foram colocados em lâminas e na presença de ácido acético glacial (45%) foram esmagados sob lamínulas. A contagem dos cromossomos foi efetuada em 20 células com auxílio de um microscópio óptico (LEICA DMLB; Leica, Wetzlar, Germany) com câmara fotográfica

acoplada (Nikon – Coolpix 995). As células, que apresentaram melhor visualização dos cromossomos foram fotografadas.

TABELA 12 - Denominação, procedência e classificação de 13 cultivares de hemerocale quanto ao nível de ploidia de acordo com “American Hemerocallis Society”.

Cultivar	Procedência	Ploidia
‘Caribbean Snowcap’	“Earlybird Daylilies”, KA	Diplóide
‘Gentle Shepherd’	“Borden´s Daylily Garden”, TN	Diplóide
‘Stolen Treasure’	“Delano Daylilies”, TN	*
‘Sugar Candy’	“Borden´s Daylily Garden”, TN	*
‘Siloam Nugget’	“Borden´s Daylily Garden”, TN	Diplóide
‘Cinderella’s Dark Side’	“Borden´s Daylily Garden”, TN	Diplóide
‘Siloam June Bug’	“Oakes Daylilies”, TN	Diplóide
‘Dragons Eye’	“Oakes Daylilies”, TN	*
‘Siloam Show Girl’	“Borden´s Daylily Garden”, TN	Diplóide
‘Double Cranberry Ruffles’	“Delano Daylilies”, TN	Diplóide
‘Green Spider’	“Dowis Ranch”, IL	Diplóide
‘Cleopatra’	“Oakes Daylilies”, TN	Diplóide
‘Snowing Down South’	“Delano Daylilies”, TN	Diplóide

* ploidias não conhecidas e/ou não citadas nos registros “The American Hemerocallis Society”.

KA = Kansas; TN = Tennessee; IL = Illinois.

TABELA 13 - Metodologias utilizadas para contagem de cromossomos em cultivares de hemerocale. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.

Metodologia	Metodologia 1	Metodologia 2	Metodologia 3	Metodologia 4	Metodologia 5	Metodologia 6
Pré-tratamento	8-hidroxiquinolina (0,02%) durante 3h	8-hidroxiquinolina (0,02%) durante 3 h	H ₂ O à 4°C durante 12h	H ₂ O à 4°C durante 12h	H ₂ O à 4°C durante 24h	H ₂ O à 4°C durante 24h
Lavado	água destilada	água destilada	Água destilada	água destilada	água destilada	água destilada
Fixação	álcool absoluto – ácido acético 3:1 à temperatura ambiente durante 7 dias	álcool absoluto – ácido acético 3:1 à temperatura ambiente durante 7 dias	álcool absoluto – ácido acético 3:1 à 4°C durante 24 h	álcool absoluto – ácido acético 3:1 à 4°C durante 24 h	álcool absoluto – ácido acético 3:1 à temperatura ambiente durante 36h	álcool absoluto – ácido acético 3:1 à temperatura ambiente durante 36h
Lavado	água destilada	água destilada	Água destilada	água destilada	água destilada	água destilada
Hidrólise	HCL 1N à 60°C, durante 15 min	HCL 1N à 60°C, durante 15 min	HCL 1N – ácido acético 45% (1:2) à 60°C, durante 3 min	HCL 1N – ácido acético 45% (1:2) à 60°C, durante 3 min	HCL 1N à 60°C, durante 8 min	HCL 1N à 60°C, durante 8 min
Lavado	água destilada	água destilada	Água destilada	água destilada	água destilada	água destilada
Coloração	Hematoxilina férrica à 60°C durante 2h	aceto-orceína 2%.à temperature ambiente durante 15 min	Hematoxilina férrica à 60°C durante 2h	aceto-orceína 2% à temperature ambiente durante 15 min	Hematoxilina férrica à 60°C durante 2h	aceto-orceína 2% à temperature ambiente durante 15 min

Metodologias 1 e 2 baseadas em Pinares (2001) com modificações; Metodologias 3 e 4 baseadas em Saito *et al.* (2003) com modificações; Metodologias 5 e 6 baseadas em Lovatto e Battistin (1997) com modificações.

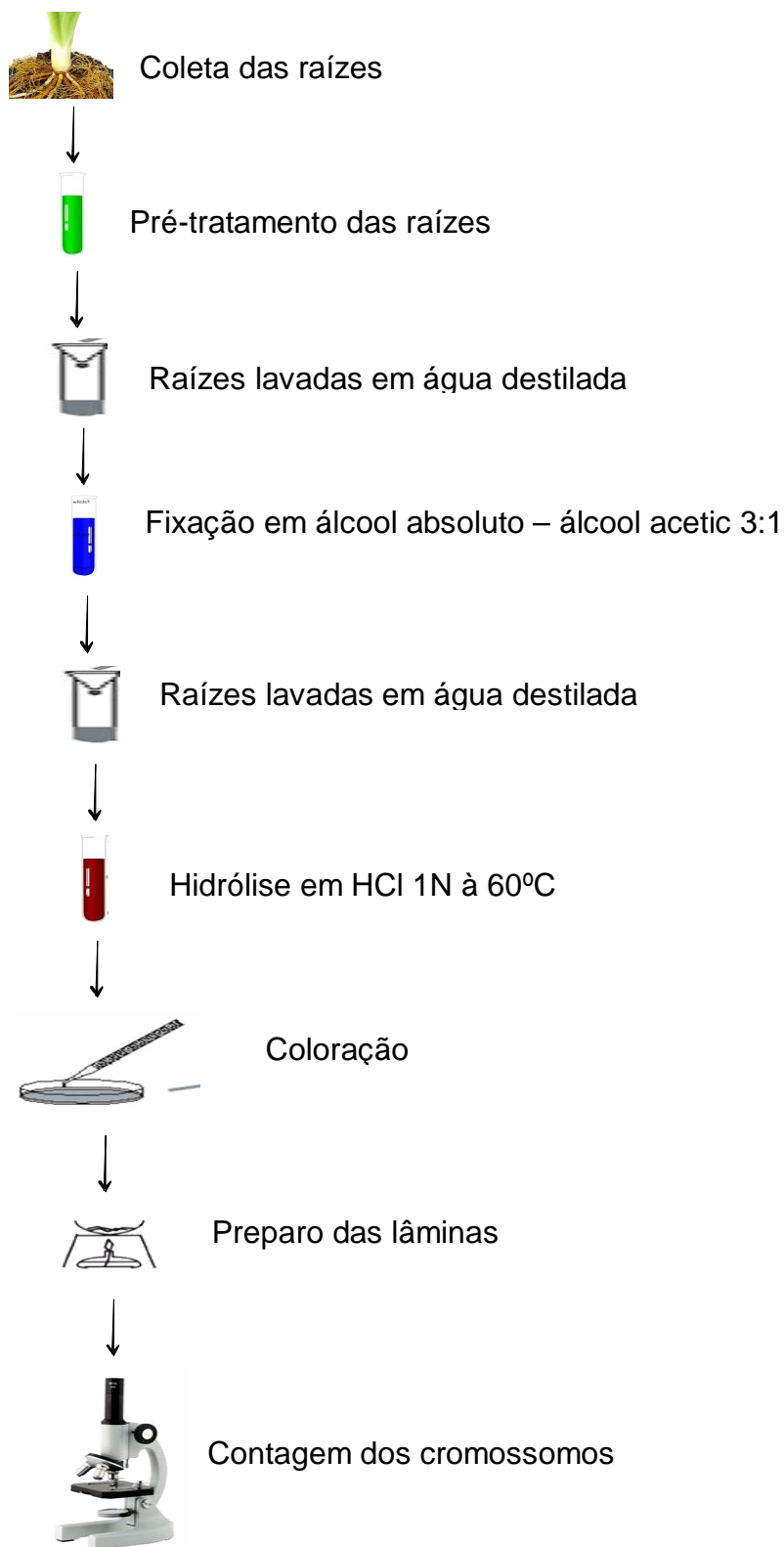


FIGURA 6 - Diagrama da metodologia de análise citogenética convencional. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 METODOLOGIAS PARA PREPARAÇÃO CITOGENÉTICA

Dentre os seis tratamentos realizados, as melhores preparações, com cromossomos individualizados, apresentando morfologia nítida, foram obtidos com os tratamentos 1 e 2. Ambos apresentaram respostas similares, ou seja, cromossomos com grau de condensação adequado para sua contagem.

Os demais tratamentos possibilitaram a separação e a coloração das células, porém não foi possível visualizar os cromossomos. Esses resultados discordam de Saito *et al.* (2003) e Lovatto e Battistin (1997), os quais visualizaram e efetuaram a contagem dos cromossomos em espécies e cultivares de *hemerocale* por meio das metodologias utilizadas nos tratamentos 4 e 6.

O resultado positivo dos tratamentos 1 e 2 possivelmente se deve ao pré-tratamento das raízes utilizado. Esse é um passo de importância essencial para o preparo das amostras visando a análise dos cromossomos e tem como objetivo principal a inibição do fuso mitótico, para que a célula permaneça estacionada na fase de metáfase e que os cromossomos possam estar espalhados pela célula (SINGH, 2002; MARTIM, 2003; MONDIN e DOCHA NETO, 2006).

Existem inúmeras maneiras de se inibir o fuso mitótico. A maneira mais comum se dá por meio de tratamentos químicos. De acordo com Bennett e Leitch (1997) a escolha do tipo de pré-tratamento é dependente do tamanho dos cromossomos, o qual pode ser muito variável devido à grande diferença do conteúdo de DNA entre as espécies de plantas. Várias soluções têm sido utilizadas em pré-tratamento de raízes, no entanto, a solução de 8-hidroxiquinolina (0,02%) tem sido efetiva em plantas que possuem cromossomos de tamanhos pequenos (SINGH, 2002). Tal afirmativa pode ser comprovada no presente trabalho. Ao analisar os cromossomos das cultivares de *hemerocale*, que apresentam tamanho pequeno em média 5,0 μm (LOVATTO e BATTISTIN, 1997), foi observado melhores resultados nos tratamentos que foram utilizados a solução de 8-hidroxiquinolina. Esses resultados discordam dos apresentados por Cuco *et al.* (2003), que verificaram que as preparações de raízes de *Passiflora* tratadas apenas com 8-hidroxiquinolina apresentaram menor número de

metáfases com os cromossomos bem condensados, geralmente apresentando maior grau de sobreposição.

O fixador usado no presente trabalho foi semelhante em todos os tratamentos. Entretanto, o tempo de exposição ao fixador variou, e isso provavelmente proporcionou diferença qualitativa na análise das lâminas. Resultados semelhantes foram encontrados por Vieira *et al.* (2004) em células meristemáticas radiculares de girassol, os quais verificaram melhoria na análise de lâminas quando raízes foram expostas ao fixador por um tempo maior.

Quanto à coloração, existem alternativas de coloração dos tecidos meristemáticos ou das lâminas diretamente, como o Corante Giemsa, as orceínas, os cormins e a hematoxilina férrica (MONDIN e DOCHA NETO, 2006). No presente trabalho verificou-se que ambos os corantes utilizados, hematoxilina férrica e orceína acética, apresentaram cromossomos mais nítidos (Figura 7).

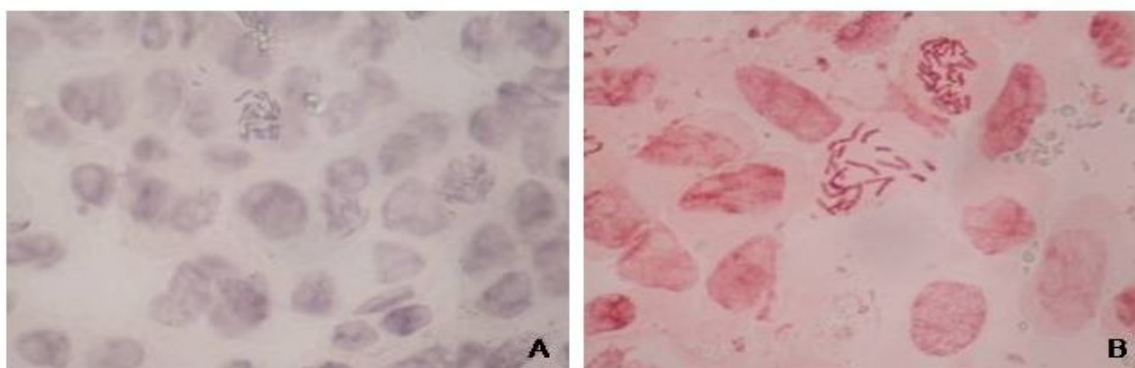


FIGURA 7 - Metáfases de hemerocale em preparações coradas: **A.** hematoxilina férrica, **B.** Orceína acética. Laboratório de Horticultura Ornamental, FL, 2008.

5.3.2 QUANTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA

Após definida a metodologia mais adequada para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas, com cromossomos individualizados, apresentando morfologia nítida, o nível de ploidia para as cultivares de hemerocale foi quantificado e confirmado.

Ao analisar as treze cultivares de hemerocale, verificou-se uma variação de 20 a 24 cromossomos em algumas células (em média quatro células em 20 células avaliadas) de algumas cultivares ('Snowing Down South', 'Double Cranberry Ruffles' e 'Stolen Treasure').

Apesar de haver pouca variação no número de cromossomos, o número cromossômico diplóide $2n = 22$ foi predominante em todas as cultivares analisados (Tabela 14, Figuras 8 e 9), portanto o número básico é $x = 11$ corroborando com estudos realizados por Zadoo *et al.* (1975) e Vijayavalli e Mathew (1990).

TABELA 14 - Número cromossômico de 13 cultivares de hemerocale analisadas por meio da técnica de contagem de cromossomos convencional, Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.

Cultivar	Número cromossômico	Ploidia
'Caribbean Snowcap'	$2n = 22$	Diplóide
'Gentle Shepherd'	$2n = 22$	Diplóide
'Stolen Treasure'	$2n = 22$	Diplóide
'Sugar Candy'	$2n = 22$	Diplóide
'Siloam Nugget'	$2n = 22$	Diplóide
'Cinderella's Dark Side'	$2n = 22$	Diplóide
'Siloam June Bug'	$2n = 22$	Diplóide
'Dragons Eye'	$2n = 22$	Diplóide
'Siloam Show Girl'	$2n = 22$	Diplóide
'Double Cranberry Ruffles'	$2n = 22$	Diplóide
'Green Spider'	$2n = 22$	Diplóide
'Cleopatra'	$2n = 22$	Diplóide
'Snowing Down South'	$2n = 22$	Diplóide

Não foi observado diferença de ploidia entre as cultivares analisadas, esses resultados descartam a possibilidade de que os genitores utilizados no programa de melhoramento não fossem diplóides e consequentemente fossem responsáveis pela não formação de sementes. Segundo Petit e Peat (2000) plantas de *hemerocale* devem ser hibridizadas com plantas de mesma ploidia para obter sucesso na formação de sementes.

É possível supor que a não formação de sementes nos cruzamentos direcionados se deva à incompatibilidade (incapacidade de uma planta fértil formar sementes). Esse mecanismo foi verificado em estudo realizado por Stout e Chandler (1933), os quais observaram que em cruzamentos realizados em *Hemerocallis thunbergi* e *Hemerocallis citrina* uma pequena parcela de tubos polínicos resultante das fecundações alcançaram e penetraram os óvulos. No entanto, estudos mais aprofundados são necessários.

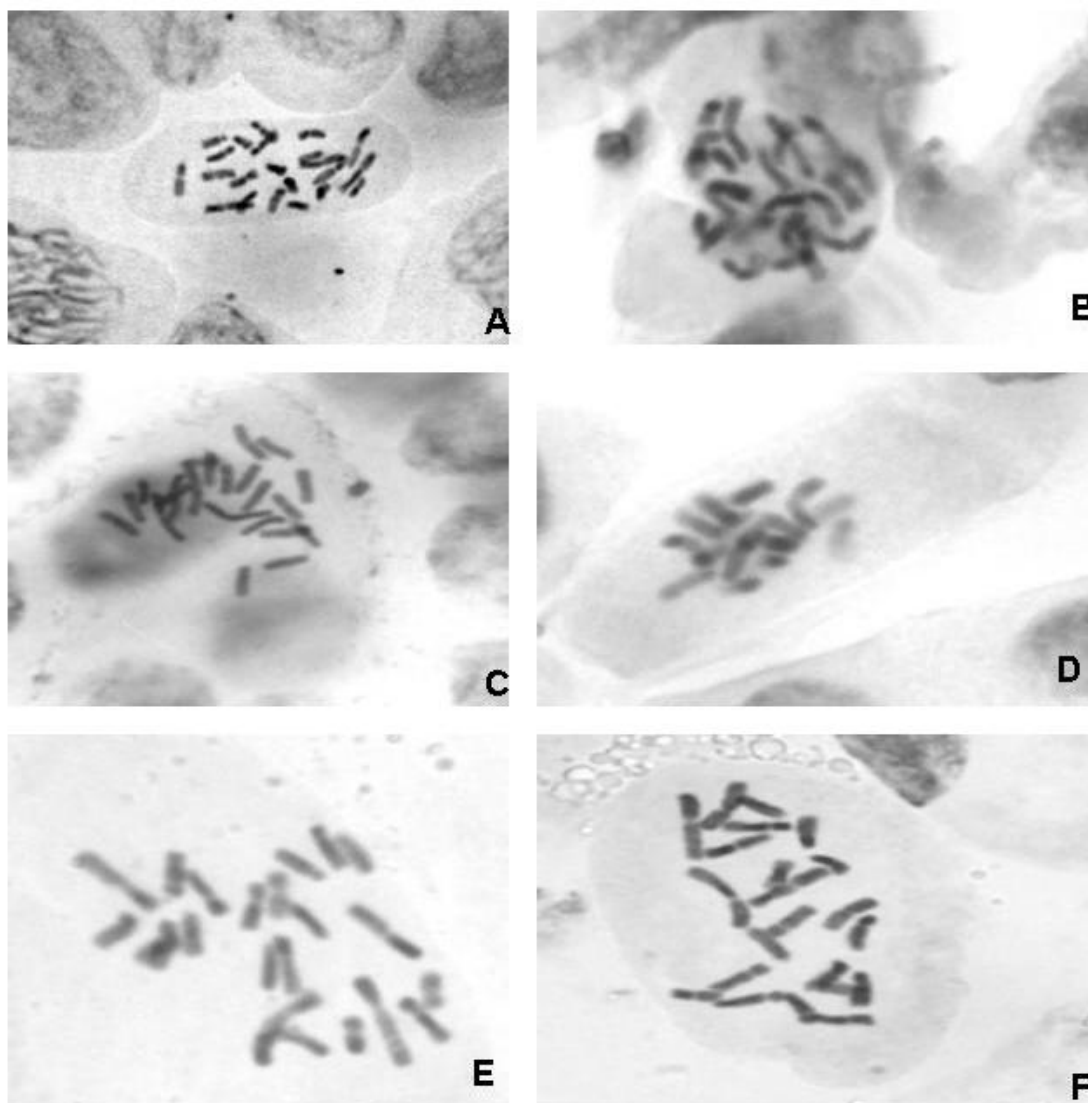


FIGURA 8 - Cromossomos mitóticos de cultivares de *hemerocale*. A. 'Siloam June Bug'; B. 'Siloam Nugget'; C. 'Cinderella's Dark Side'; D. 'Sugar Candy'; E. 'Siloam Show Girl'; F. 'Snowing Down South', obtidos por meio da técnica de contagem de cromossomos convencional. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.

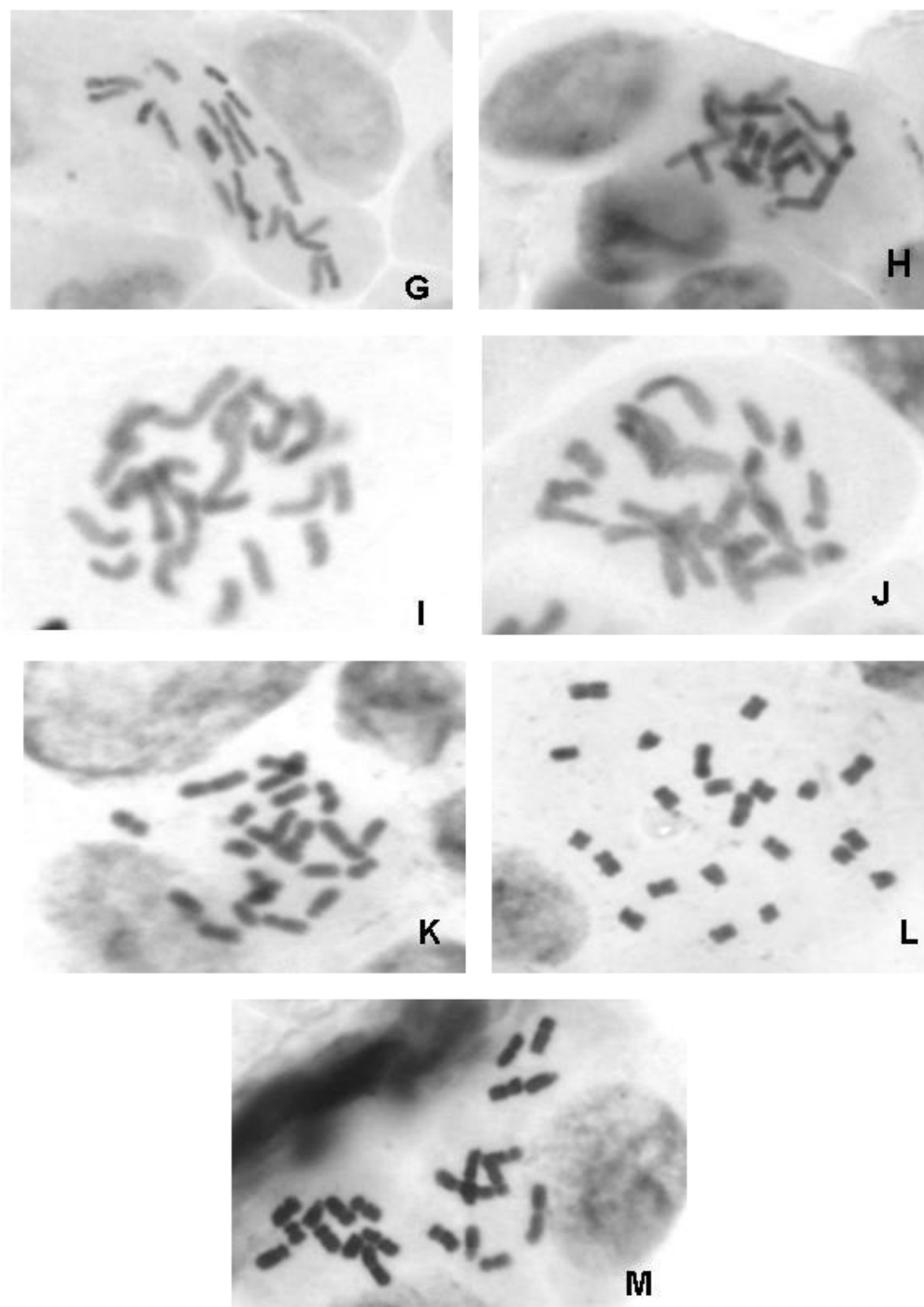


FIGURA 9 - Cromossomos mitóticos de cultivares de *Hemerocallis*. G. 'Caribbean Snowcap'; H. 'Stolen Treasure'; I. 'Double Cranberry Ruffles'; J. 'Dragons Eye'; K. 'Gentle Shepherd'; L. 'Cleopatra', M. 'Green Spider', obtidos por meio da técnica de contagem de cromossomos convencional. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.

5.4 CONCLUSÕES

Dentre os seis tratamentos testados, a metodologia utilizada por Pinares (2001) com algumas modificações foi a que apresentou cromossomos com morfologia nítida.

A análise de quantificação revelou que as cultivares analisadas apresentaram número cromossômico diplóide ($2n = 22$), confirmando-se assim sua ploidia.

O nível de ploidia não foi responsável pela não formação de sementes nos cruzamentos direcionados. Possivelmente esse efeito foi devido à incompatibilidade, no entanto estudos mais aprofundados são necessários.

5.5 REFERÊNCIAS

- American Hemerocallis Society (AHS). Disponível em: <<http://www.daylilies.org>>
Acesso em 15 de out. de 2004
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear amounts in Angiosperms - 583 new estimates. **Annals of Botany**, v. 80, p. 169-196, 1997.
- BRENNAN, J. R. Chromosomes of *Hemerocallis*. **Daylily Journal**, v. 47, p. 73-77, 1992.
- CUCO, S. M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M. L. C.; PERECIN, M. L. R. A. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 363-370, 2003.
- DE SCHEPPER, S.; LEUS, L.; MERTENS, M.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M.; DEBERGH, P.; HEURSEL, J. Flow cytometric analysis of ploidy in *Rhododendron* (subgenus *Tsutsusi*). **HortScience**, v.36, n. 1, p. 125-127, 2001.
- EECKHAUT, T.; SAMIJN, G.; VAN BOCKSTAELE, E. Interespecific breeding in the *Rhododendron* genus involving *R. simsii* hybrids. **Acta Horticulturae**, v. 612, p. 165-172, 2003.
- KRIKORIAN, A. D.; STAICU, S. A.; KANN, R. P. Karyotype analysis of a daylily clone reared from aseptically cultured tissues. **Annals of Botany**, v. 47, p. 121-131, 1981.
- LOVATTO, M. T.; BATTISTIN, A. Citogenética em cinco espécies ornamentais de liliales. **Ciência Rural**, v. 27, n. 4, p. 583-587, 1997.
- MARTIN, X. X. Caracterización citogenética de la variabilidad en plantas. In: **Marcadores moleculares nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas**, Havana, p 67-91, 2003.
- MONDIN, M.; DOCHA NETO, A. Citogenética vegetal enfatizando a família Orchidaceae. **Orchistudium**, v. 4, p. 24-54, 2006.
- PETIT, T. L.; PEAT, J. P. **The Color Encyclopedia of Daylilies**. Portland, Oregon: Timber Press, 2000. 300p.

- PINARES, A.; RAMOS, Y.; GONZÁLEZ, C.; XIQUEZ, X. Caracterización genético bioquímico y citogenética de 16 accesiones de *Clitoria ternatea* L. (Genetic bioquimic and citogenetic characterization of *Clitoria ternatea* L.). **Revista do Jardim Botânico Nacional, Havana**, v. 22, n. 2, p. 285-292, 2001.
- SAITO, H.; MIZUNASHI, K.; TANAKA, S.; ADACHI, Y.; NAKANO, M. Ploidy estimation in *Hemerocallis* species and cultivares by flow cytometry. **Scientia Horticulturae**, v. 97, p.185-192, 2003.
- SAKHANOKHO, H. F. ; POUNDERS, C. Polidy variation in *Hedychium* species and cultivars. **SNA Research Conference**. v. 50, p.665-667, 2005.
- SINGH, R. J. **Plant Cytogenetics**. 2. Ed. Boca Raton, Fl: CRC Press, 2002, 463p.
- STOUT, A.B.; CHANDLER, C. Pollen-tube behavior in *Hemerocallis* with special reference to incompatibilities. **Bulletin of the Torrey Club**, v. 60, p. 397-417, 1933.
- TOMBOLATO, A. F. C. Hemerocale – *Hemerocallis hybrida*. In: **Cultivo Comercial de Plantas Ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 176-211, 2004.
- TOMKINS, J. P.; WOOD, T. C.; BARNES, L. S.; WESTMAN, A.; WING, R. A. Evaluation of genetic variation in the daylily (*Hemerocallis* spp) using AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 489-496, 2001.
- VIEIRA, C. B.; VARGAS, D. P.; BOBROWSKI, V. L.; ROCHA, B. H. G. Otimização de procedimentos citológicos para análise de células meristemáticas radiculares de girassol. **II Congresso de Biociências**. 2004
- VIJAYAVALLI, B.; MATHEW, P. M. **Cytotaxonomy of the Liliaceae and allied families**. Kerala. India: Continetal Publications, 1990. 187p.
- ZADOO, S. N.; ROY, R. P.; KHOSHOO, T. N. Variaton in karyotype in *Hemerocallis*. **La Cellule**, v. 71, p. 253-271, 1975.

6 CAPÍTULO IV
DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES COMERCIAIS DE HEMEROCALIS
ANALISADAS POR MEIO DE MARCADORES RAPD e SSR

RESUMO

Em um programa de melhoramento de *Hemerocallis X hybrida* Hort. verificou-se que os cruzamentos apresentaram um ganho genético relativamente baixo. Para esse resultado a proximidade genética não pode teoricamente ser rejeitada como possível explicação, tendo em vista a falta de informação sobre a identificação de parentais de algumas cultivares utilizadas. Considerando que o conhecimento da diversidade genética de uma espécie fornece subsídios para o melhoramento genético da mesma, o presente trabalho teve como objetivo verificar a diversidade genética entre 13 cultivares de hemerocale por meio dos marcadores moleculares RAPD e SSR, verificar se a proximidade genética influenciou nos valores obtidos para o ganho genético e comparar a eficiência desses marcadores. Quinze iniciadores aleatórios e 10 SSR foram testados. Para a determinação da matriz de similaridade foi utilizado o índice de Jaccard com o programa NTSYS pc 2.02, e para a construção do dendrograma foi utilizado o método de agrupamento UPGMA. O coeficiente de similaridade variou de 0,22 a 0,69 para RAPD e de 0,20 a 0,85 para SSR. Comparando valores de similaridade genética com valores de ganho genético, esses se apresentaram inversamente proporcional ao ganho genético para o marcador RAPD, e para o marcador SSR esse comportamento ocorreu para algumas famílias. O dendrograma gerado pelo método UPGMA dividiu as 13 cultivares de hemerocale em dois grupos para os dois marcadores testados. Dentre os marcadores testados, SSR foi mais eficiente na identificação de similaridade genética entre as cultivares estudadas.

Palavras-chave: *Hemerocallis X hybrida* Hort., planta ornamental, similaridade genética, marcador molecular, “Random amplified polymorphic DNA”, microsatélites.

GENETIC DIVERSITY AMONG DAYLILIES CULTIVARS USING MOLECULAR MARKERS, RAPD AND SSR

ABSTRACT

In a breeding program for *Hemerocallis X hybrid* Hort., it was verified that the crossings showed a low genetic gain. For this result the genetic proximity cannot be rejected as a possible explanation. Considering that the knowledge about the genetic diversity of a species provides subsidies to a breeding program, this study aimed to estimate the genetic diversity among 13 daylilies cultivars using molecular markers, such as RAPD and SSR. Fifteen RAPD primers and 10 SSR primers were tested. The results were assessed using the NTSys program. Jaccard's coefficient of similarity was calculated for all pairwise comparisons between cultivars and a dendrogram was obtained by UPGMA (unweighted pair group method using an arithmetic average method). The genetic similarity coefficient ranged from 0.22 to 0.69 (RAPD) and from 0.20 to 0.85 (SSRs). Comparing values of genetic similarity with genetic gain, RAPD analysis was proportionally inverse. Likewise, for SSR this behavior occurred in some families. A dendrogram obtained for UPGMA divided the 13 daylilies cultivars into two groups. SSR was more efficient in the identification of genetic similarity among the cultivars studied.

Key-words: *Hemerocallis X hybrida* Hort., ornamental plant, genetic similarity, molecular markers, Random amplified polymorphic DNA, microsatellites.

6.1 INTRODUÇÃO

Hemerocallis X hybrida Hort., também conhecida como lírio-de-são-jo-se e hemerocale, é uma espécie monocotiledônea, perene, herbácea da família *Hemerocalidaceae* (ERHARDT, 1992; PETIT e CALLAWAY, 2000). Essa espécie é adaptada a diferentes tipos de solo e clima e exibe um alto grau de variação morfológica em função do intenso melhoramento realizado.

Apesar dos vários anos de hibridizações realizadas em hemerocale, ainda persiste uma carência de informações sobre diversos aspectos genéticos (TOMKINS *et al.*, 2001), especialmente a disponibilidade de variabilidade genética, pré-requisito para um programa de melhoramento (PRASAD *et al.*, 2000). Estudo realizado por Tomkins *et al.* (2001) sobre os efeitos de intensas hibridizações em 100 cultivares de hemerocale por meio do uso de marcadores AFLP revelou que o aumento de hibridizações proporcionou um aumento na média de similaridade. Em contrapartida, a diversidade genética foi diminuindo entre as cultivares.

O desconhecimento da variabilidade genética e, sobretudo da distância genética entre cultivares que serão utilizadas em um programa de melhoramento pode promover resultados não satisfatórios (CHAKRABARTY *et al.*, 2007). Isso foi observado em um programa de melhoramento de hemerocale, realizado durante o período de 2004 a 2007, apresentado no capítulo I. Neste programa verificou-se que os cruzamentos apresentaram um ganho genético relativamente baixo. Para esse resultado, a proximidade genética não pode teoricamente ser rejeitada como possível explicação, tendo em vista a não identificação de parentais de algumas cultivares utilizadas nesse programa de melhoramento.

Apesar de ganhos genéticos terem sido obtidos na seleção de características de interesse no hemerocale, a expectativa do avanço genético e obtenção de indivíduos ainda melhores permanece. Para que um programa de melhoramento alcance um avanço genético é necessário o conhecimento da relação genética existente na população. Pois esse conhecimento permite selecionar progenitores, assim como avaliar e caracterizar os recursos genéticos disponíveis para fazer uso eficiente da variabilidade genética (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; MOREIRA *et al.*, 1994).

Dentre os métodos utilizados, marcadores moleculares são empregados extensivamente e com sucesso na análise genética de plantas e na caracterização da variabilidade existente entre os indivíduos (MEEROW, 2005). Dentre os marcadores moleculares destaca-se o RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"). Esse marcador oferece a vantagem de ser mais simples, mais barato e que consome menos tempo quando comparado com outros marcadores (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Para espécies ornamentais este marcador vem sendo utilizado para a caracterização de cultivares (WOLF e PETERS – VAN, 1993; ANASTASSOPOULOS e KEIL, 1996; KO *et al.*, 1998; JAN *et al.*, 1999; CHAKRABARTY *et al.*, 2007 e BRUNA *et al.*, 2004), em estudo de associações genéticas (CHUNG *et al.*, 2001; TAYWIYA *et al.*, 2008), na paternidade de híbridos interespecíficos (BENEDETTI *et al.*, 2000) e na detecção de cultivares resistentes à patógenos (DALLAVALLE *et al.*, 2002).

Outro marcador muito utilizado em estudo de relação genética, paternidade de híbridos interespecíficos e na detecção de genes resistentes à patógenos em plantas ornamentais é o SSR (Microsatélites). Esse marcador apresenta elevado polimorfismo, alta reprodutibilidade e carácter co-dominante características importantes para análise baseada em marcadores moleculares (TAUTZ, 1989, MORGANTE e OLIVIERI, 1993; GUPTA *et al.*, 1996; POWELL *et al.*, 1996, JONES *et al.*, 1997; RUSSELL *et al.*, 1997; MILACH *et al.*, 1998; BUSO *et al.*, 2003; PRASAD *et al.*, 2000; VARSHNEY *et al.*, 2005). Recentemente, vários microsatélites foram isolados e caracterizados em diversas espécies de plantas ornamentais, incluindo *Rhododendron matternichii* (NAITO *et al.*, 1998), *Iris* (BURKE *et al.*, 1999), *Pelargonium* (BECHER *et al.*, 2000), *Primula* (ISAGI *et al.*, 2001), *Begonia sutherlandii* (HUGHES *et al.*, 2002), *Lilium philadelphium* (HORNING *et al.*, 2003), *Rosa damascena* (BAYDAR *et al.*, 2004), *Hemerocallis* (MIYAKE e YAHARA, 2006) *Hosta* (YAMAMOTO *et al.*, 2008).

Considerando que o conhecimento da diversidade genética de uma espécie fornece subsídios tanto para conservação da espécie quanto para o melhoramento genético da mesma, o presente trabalho teve como objetivo verificar a diversidade genética entre 13 cultivares de hemerocale por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") e SSR (Microsatélites), e comparar a eficiência desses marcadores.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 MATERIAL VEGETAL

Treze cultivares de hemerocale (Tabela 15) diplóides foram cultivadas em vasos de polietileno com diâmetro de 25 cm e capacidade para 12 L de substrato (Fafard Growing Mix®), em ambiente aberto, sem restrição hídrica, no Departamento de Horticultura Ambiental, da Universidade da Flórida (UF-IFAS-TREC), localizado em Homestead, Flórida, USA.

6.2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Após dois meses do plantio das cultivares, 100 mg de material fresco (folhas) de hemerocale foram maceradas em nitrogênio líquido, em seguida foi utilizado o “DNeasy Plant Mini Kit from Qiagen” (2006). A qualidade e quantidade do DNA foi verificada após a extração por meio de eletroforese em gel e a imagem foi posteriormente analisada.

TABELA 15 – Denominação e procedência de 13 cultivares de hemerocale de acordo com “American Hemerocallis Society”.

Cultivar	Procedência/ Híbridos	Parentais
1 – ‘Siloam June Bug’	“Oakes Daylilies”, TN/Henry P, 1978	*
2 – ‘Siloam Nugget’	“Borden’s Daylily Garden”, TN/Henry P, 1976	*
3 – ‘Cinderella’s Dark Side’	“Borden’s Daylily Garden”, TN/APPS, 1995	(‘Pardom me’ x ‘Eleanor Apps’) x ‘Little Squiz’
4 – ‘Sugar Candy’	“Borden’s Daylily Garden”, TN/Pigg, 1995	*
5 – ‘Siloam Show Girl’	“Borden’s Daylily Garden”, TN/Henry P, 1981	*
6 – ‘Snowing Down South’	“Delano Daylilies”, TN/Scott E, 1997	‘Gentle Shepherd’ x sdlg
7 – ‘Caribbean Snowcap’	“Earlybird Daylilies”, KA/ Talbott, 1997	‘Caribbean D. Elkens’ x ‘Just Celebrate’
8 – ‘Stolen Treasure’	“Delano Daylilies”, TN/ Doughert H, 1996	‘BorderCrossing’ x sdlg
9 – ‘Double Cranberry Ruffles’	“Delano Daylilies”, TN/ Talbott, 1991	‘Stroke of Midnight’ x ‘Siloam Double Rose’
10 – ‘Dragons Eye’	“Oakes Daylilies”, TN/ Salter E.H, 1991	‘Enchantes Spell’ x ‘Janice Brown’
11 – ‘Gentle Shepherd’	“Borden’s Daylily Garden”, TN/Yancey, 1980	Sdlg x sdlg
12 – ‘Cleopatra’	“Oakes Daylilies”, TN/ Thomas, 1964	*
13 – ‘Green Spider’	“Dowis Ranch”, IL/ Terry, 1960	‘Parfait’ x sdlg

* parentais não citados nos registros “The American Hemerocallis Society”.

Sdlg = “seedling”, origem desconhecida.

6.2.3 MARCADOR RAPD

A análise de RAPD foi realizada no Laboratório de Horticultura Ornamental do Departamento de Horticultura Ambiental, da Universidade da Flórida (UF-IFAS-TREC), localizado em Homestead, Flórida, USA.

As treze cultivares de *hemerocallis* foram rastreadas com 15 iniciadores (OPA – 01, OPA – 04, OPA – 07, OPA – 08, OPA – 09, OPA – 11, OPA – 12, OPA -14, OPA – 16, OPA – 19, OPB – 03, OPB – 06, OPB – 10, OPB – 13, OPB – 20) (“Operon Technologies”). O volume total da reação foi de 13 µl, contendo 5,68 µl de água; 1,3 µl 10x PCR Buffer (sem MgCl₂); 0,78 µl de MgCl₂ (25 mM); 1,04 µl de dNTPs (2,5 mM); 3,0 µl de iniciador (10 µM); 0,2 µl de Taq “polimerase” (5U/µl, Qiagen) e 1 µl (10 ng de DNA) de acordo com técnica descrita por Ferreira e Grattapaglia (1998).

O termociclador (PTC- 100 Peltier Thermal cycle) foi programado para 1 ciclo de 5 min a 94 °C seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 37 °C e 2 min a 72 °C. Finalmente 1 ciclo de 2 min a 72 °C, e então, diminuiu a temperatura para 4 °C. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose de 2% em buffer TAE 1X. Os géis foram expostos em luz UV e fotografados para posterior análise. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado com o uso de 100 pb DNA “ladder” (Sigma, St Louis, MO). Todas as reações foram repetidas duas vezes e somente aquelas que apresentaram reprodutibilidade em todas as corridas foram consideradas para análises dos dados.

6.2.3.1 Análise de dados

Cada banda de RAPD foi considerada como uma banda independente com dois alelos, presença ou ausência de bandas. Os fragmentos amplificados foram anotados manualmente, “1” para presença e “0” para ausência, em seguida foi gerada uma matriz binária. O coeficiente para o cálculo de similaridade genética utilizado para a análise dos indivíduos foi o de Jaccard (ROHLF, 2000). Com os dados de similaridade foi realizada a análise de agrupamento (módulo SAHN), utilizando o método da média das distâncias genéticas (UPGMA), sendo que o ajuste entre a matriz de distâncias e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (*r*) (SOKAL e ROHLF, 1962). Para a construção do

dendrograma foi utilizado o programa computacional “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System” (NTSYS pc 2.02) (ROHLF, 2000). A estabilidade dos agrupamentos do dendrograma foi verificado pelo programa dBood versão 3.1 pc. (COELHO, 2001) pelo procedimento de reamostragem com 10000 “bootstraps”. O coeficiente médio de similaridade foi determinado por meio da média aritmética de todas as similaridades das amostras entre si.

6.2.4 MARCADOR SSR

A análise de SSR foi realizada no Laboratório de Genética Vegetal, Embrapa Recursos Genéticos Vegetais e Biotecnologia – Cenargen, Brasília, DF.

Para o estudo de genotipagem das treze cultivares de *hemerocallis*, um conjunto de 10 pares de iniciadores microssatélites foi selecionado de acordo com trabalho realizado por Miyake e Yahara (2006) (Tabela 16). Seis iniciadores foram marcados com fluorescências: 6-FAM (azul) e quatro com fluorescência HEX (verde).

Para verificar a validação dos iniciadores selecionados, reações foram amplificadas com Kit QIAGEN® Multiplexer PCR com 2 ng de DNA, 2,5 μ M de Master mix, 0,5 μ M de Q-Solution, as concentrações dos iniciadores variaram entre 0,1 μ L (6-Fam) e 0,2 μ L (Hex), adicionou-se H₂O “RNAfree” até completar o volume da reação para 5 μ L. O programa para a amplificação dos produtos utilizado foi: (1) 95°C por 15 min, (2) 95°C por 30 seg (3) 54°C - 60°C por 1 e 30 min, conforme temperatura de anelamento do iniciador (Tabela 2), (4) 72°C por 1 min, (5) passos 2, 3 e 4 por 35 vezes e (6) 72°C por 30 min para extensão final. Após a PCR foi feita a eletroforese dos produtos obtidos em gel de agarose 2%. Com os resultados obtidos foi feita a otimização da temperatura de anelamento e da concentração necessária de iniciadores, e o tamanho de fragmentos observados. Em seguida, foram elaborados painéis multiplex (Tabela 17).

As reações dos painéis multiplex para os estudos genéticos de validação foram amplificadas com Kit QIAGEN® Multiplexer PCR de acordo com Tabela 17. As reações foram amplificadas sob as condições: (1) 95°C por 15 min, (2) 95°C por 30 seg (3) 57°C por 1 e 30 min, (4) 72°C por 1 min, (5) passos 2, 3 e 4 por 35 vezes e (6) 72°C por 30 min para extensão final. As reações de amplificação foram feitas em

placas de PCR para 96 amostras em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer). As amostras amplificadas foram diluídas cinco vezes com água milliQ, 1 µL da amostra diluída foi transferida para uma mistura (8,88: 0,12 mL) de 9 µL de formamida com padrão interno de tamanho conhecido com 12 fragmentos – (Rox-Psport) desenvolvido por Grattapaglia (2007 - comunicação pessoal) seguida de desnaturação a 95°C por 5 min. Os produtos foram eletroinjetados em seqüenciador automático de DNA (ABI 3700, “Applied Biosystems”) e utilizado o filtro D para captação das fluorescências.

TABELA 16 - Seqüência dos pares de iniciadores selecionados para hemerocale com as respectivas “motifs”, amplitudes alélicas (pb), temperaturas de anelamento (Ta). Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009.

Locos	“Motifs”	Seqüência dos iniciadores (5’ – 3’)	Fragmento esperado	Ta (°C)
Hem C4 (6-Fam)	(CA) ₂₄	F: TGGGTCGCATAAAATGTGAA R: AAGTGCACAACGGAAGGTTT	106	54
Hem C18 (HEX)	(CT) ₂₃	F: TGAACAAAACGAACCGACAA R: CATGCTTTTTTGGGCATGAAT	175	54
Hem C24 (HEX)	(CT) ₉ CT (GT) ₉	F: CTTGTGAAGGCTGACATCCA R: CACGTGTAAACGGGCAAAAC	154	54
Hem C29 (6-Fam)	(GT) ₁₀ GA(GT) ₈ (AT) ₆ (GT) ₂₅	F: CGGAAGGGAAGTGGGATAAC R: CCATTCATTTTTCCAAATCATGT	244	54
Hem C31 (6-Fam)	(CT) ₁₂ CC(CT) ₇	F: CTAAACTTGACCGCCAACG R: TTTAGGTGTTCCGGTTTTTG	188	54
Hem C8 (HEX)	(CA) ₂₁	F: TTTTGCCATTTACCCCATTT R: AGGACGCTGATTTCTGAAGG	131	57
Hem C10 (HEX)	(AC) ₂₀	F: GCAGCCATAAATCCCACAAC R: CGTACTCAGCAATGACGTTGA	176	57
Hem C22 (6-Fam)	(CA) ₂₆	F: TTTGGGTCCGTCTCATTCTC R: CCCTGGATATAATGCTTTTGTCT	161	57
Hem C203 (6-Fam)	(TG) ₁₀ (CG) ₆ ...(TC) ₁₉	F: CCTCTCGTTCATTACCAACA R: CGCACACACACACTCAGGA	300	57
Hem C16 (6-Fam)	(CA) ₂₁	F: TCAATGTCCAAGTGCTCAAACA R: TGCATTTTGTCTCTCTCGTTCA	187	60

TABELA 17 - Painéis multiplex otimizados para análise de hemerocale. Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009.

Reação PCR	Painel 1	Painel 2	Painel 3	Painel 4
Máster Mix (µL)	2,5	2,5	2,5	2,5
Q Solution (µL)	0,5	0,5	0,5	0,5
H2O RNAfree (µL)	0,4	0,7	0,55	0,5
“Primer” (µL)	Hem C18 – 0,2 Hem C29 – 0,2 Hem C31 – 0,2	Hem C8 – 0,2 Hem C22 – 0,1	Hem C10 – 0,25 Hem C203 – 0,2	Hem C4 – 0,1 Hem C24 – 0,2 Hem C16 – 0,2
DNA (2ng/ µL)	1,0	1,0	1,0	1,0
Total da Reação	5,0	5,0	5,0	5,0

6.2.4.1 Análise de dados

As análises de tamanho dos fragmentos microssatélites foi realizada utilizando o programa GeneScan versão 3.1.2. (“Applied Biosystems”). Os alelos amplificados foram determinados utilizando o programa Genotyper versão 2.5.2 (“Applied Biosystems”) baseado em tamanho de fragmento padrão de cada amostra, determinado manualmente. Os dados genotípicos gerados com duas casas decimais de precisão foram arredondados com base nas informações de “motif” utilizando o “software” Allelobin que utiliza um método de minimização através de quadrados mínimos (IDURY e CARDON, 1997).

Por meio do programa PowerMarker (v.3.25) foram estimadas a heterozigosidade observada (H_o) e diversidade gênica (DG), que é analisada conforme Nei (1987) dada pela fórmula $[GDe] = (1 - \sum p_i^2)(2n)/(2n-1)$, onde p_i é a frequência do i -ésimo alelo para cada loco e n o número de amostras analisadas o número de alelos e valores de frequência dos alelos mais frequentes e por fim, conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), na busca de marcadores mais informativos.

6.2.4.1.1 Análise da Diversidade Genética

Com o polimorfismo detectado entre os 13 acessos de cultivares de hemerocale foram estimadas as frequências alélicas, o número de alelos de cada loco, a diversidade gênica (DG) e o conteúdo polimórfico informativo (PIC). As distâncias

genéticas entre os acessos de *hemerocale* foram estimadas pelo método “Shared Allele Distance”. As estimativas foram baseadas na soma da proporção de alelos comuns entre dois acessos examinados em cada loco dividida pelo dobro do número de locos testados (BOWCOCK et al., 1994; GOLDSTEIN *et al.*, 1999), através do programa Bood (COELHO, 2000), com “bootstrapping” com 1000 randomizações. A matriz diagonal foi submetida à análise de agrupamento utilizando o método de UPGMA realizado pelo programa NTSYS pc versão 2.10 (ROHLF, 1998) que foi conferida com os resultados obtidos pelo “bootstrapping”.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 ANÁLISE RAPD

Dos 15 iniciadores testados, foram selecionados oito que produziram fragmentos de maior robustez e repetibilidade (Tabela 18). Os iniciadores selecionados produziram um total de 56 bandas, sendo 55 polimórficas, apresentando uma porcentagem de polimorfismo de 98,21% (Tabela 18). Esse alto grau de polimorfismo está de acordo com a variabilidade observada com base em caracteres morfológicos em *hemerocallis* (“American Hemerocallis Society”, 2004), e corrobora com a variabilidade genética encontrada por Tomkins *et al.* (2001) ao analisarem 100 cultivares de *Hemerocallis*. Em trabalho similar com *Lilium* estes mesmos iniciadores apresentaram de moderada a alta frequência de bandas polimórficas, com porcentagem de polimorfismo de 83% (PERSSON *et al.*, 1998).

Dentre os iniciadores selecionados, OPA – 11, OPA 7 e OPA 20, geraram o maior número de fragmentos (14, 9 e 9 respectivamente, com 100% de polimorfismo (Tabela 18).

Com relação ao tamanho das bandas amplificadas, foi observado que os iniciadores geraram uma amplitude de bandas entre 200 pb até 1500 pb (Tabela 18, Figura 10). Esta variação no tamanho está dentro da faixa esperada para marcadores RAPD, que podem teoricamente amplificar fragmentos que variam entre 200 pb e 2000 pb (BUSSEL *et al.*, 2005), e segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) esse marcador molecular pode amplificar fragmentos de até 4000 pb. Essa variação no comprimento dos fragmentos pode ser exemplificada por vários trabalhos como: em *Limonium* os fragmentos variaram de 300 a 2000 pb (BRUNA *et al.*, 2004), em *Allium* variaram de 200 a 3940 pb (HONG *et al.*, 1996), em *Phalaenopsis* variaram de 223 a 2300 pb (TAYWIYA *et al.*, 2008) e em *Hippeastrum* variaram de 100 a 1500 pb (CHAKRABARTY *et al.*, 2007).

TABELA 18 - Código e sequência do iniciador, número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem (%) de bandas polimórficas na amplificação do DNA genômico de 13 cultivares de hemerocale por meio do marcador RAPD. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.

Iniciadores	Seqüência (5' to 3')	Número total de bandas	Tamanho (bp)	Número de bandas polimórficas	% de bandas polimórficas
OPA – 07	GAAACGGGTG	9	400-1000	9	100,00
OPA – 08	GTGACGTAGG	3	600-1000	3	100,00
OPA – 11	CAATCGCCGT	14	500-1500	14	100,00
OPA – 16	AGCCAGCGAA	7	400-1500	6	85,70
OPA – 19	CAAACGTCGG	7	400-1000	7	100,00
OPB – 03	CATCCCCCTG	3	300-1000	3	100,00
OPB – 13	TTCCCCCGCT	4	300-1000	4	100,00
OPB – 20	GGACCCTTAC	9	500-1500	9	100,00
Total		56	200-1500	55	98,21

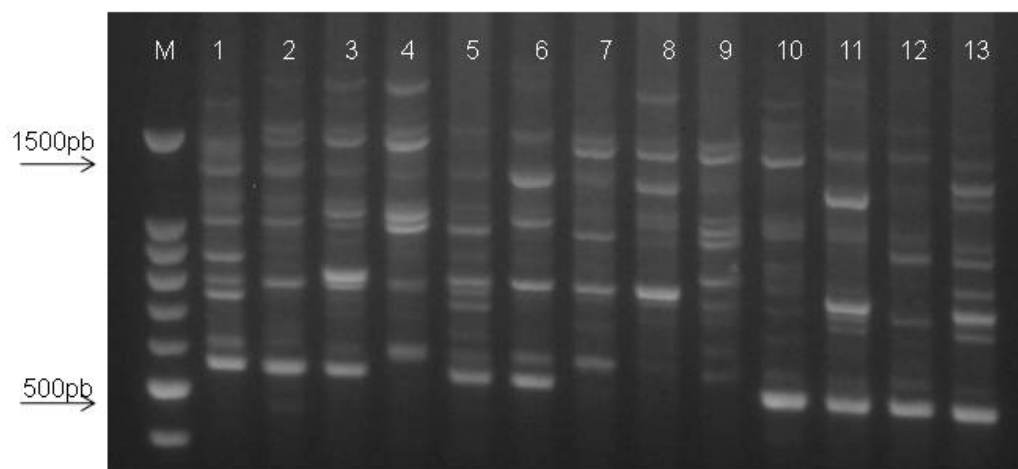


FIGURA 10 - Perfil de um gel de RAPD utilizando o iniciador OPA-11 em 13 cultivares de hemerocale. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.

6.3.2 ANÁLISE SSR

6.3.2.1 Validação dos pares de iniciadores

Antes de iniciar as reações de amplificação das regiões microssatélites fez-se necessário a otimização das condições de PCR, principalmente da temperatura de anelamento (T_a). A Tabela 19 apresenta os valores encontrados para a temperatura de anelamento e o tamanho dos fragmentos observados.

Ao observar os resultados obtidos na Tabela 19, verifica-se que a temperatura de anelamento recomendada teve que ser alterada. Para os pares de iniciadores que recomendavam a temperatura de 54°C foi necessário aumentar a temperatura para 57°C. Pois, esses iniciadores apresentaram além da banda correspondente ao microssatélite, amplificações inespecíficas. No caso do par de iniciador Hem C16, o qual era recomendado a temperatura de 60°C, ocorreu uma diminuição para 57°C. Essa redução na temperatura além de melhorar a resolução das bandas, foi extremamente vantajosa. Pois, com o uso de uma mesma temperatura permitiu o desenvolvimento de um sistema multiplex, em que vários locos puderam ser analisados simultaneamente a partir de uma única reação de PCR.

TABELA 19 - Iniciadores SSR selecionados para hemerocale com os respectivos fragmentos esperados, temperaturas de anelamento (T_a) recomendadas, fragmentos observados e temperatura de anelamento (T_a) utilizada. Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009.

Locos	Fragmento esperado	T_a (°C) Recomendada	Fragmento observado	T_a (°C) Utilizada
Hem C4 (6-Fam)	106	54	74 – 130	57
Hem C18 (HEX)	175	54	150	57
Hem C24 (HEX)	154	54	160	57
Hem C29 (6-Fam)	244	54	180 – 220	57
Hem C31 (6-Fam)	188	54	120	57
Hem C8 (HEX)	131	57	100 – 120	57
Hem C10 (HEX)	176	57	160 – 181	57

TABELA 19 - Iniciadores SSR selecionados para *hemerocallis* com os respectivos fragmentos esperados, temperaturas de anelamento (Ta) recomendadas, fragmentos observados e temperatura de anelamento (Ta) utilizada. Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009. (continuação)

Locos	Fragmento esperado	Ta (°C) recomendada	Fragmento observado	Ta (°C) Utilizada
Hem C22 (6-Fam)	161	57	124 – 155	57
Hem C203 (6-Fam)	200	57	160 290 – 300	57
Hem C16 (6-Fam)	187	60	144 – 167	57

As variações do tamanho (pb) dos alelos também foram diferentes da observada por Miyake e Yahara (2006). Um exemplo pode ser observado no caso do alelo específico gerado pelo “primer” HemC4 é 106 pb (MIYAKE e YAHARA, 2006). No presente estudo, esse mesmo alelo foi estimado em 74 - 130 pb (Tabela 19, Figura 11). Conforme sugerido por Testolin *et al.* (2000) essa discrepância pode ser devido às condições de desnaturação durante a eletroforese e às diferenças na composição de bases.

Após a verificação da validação dos pares de iniciadores, quatro painéis de marcadores microssatélites (painel multiplex) constituído por 10 pares de iniciadores marcados com fluorescência foram otimizados para a genotipagem automática em sequenciador de DNA modelo ABI 3700 (Applied Biosystems).

A análise de validação dos painéis multiplex corresponde a avaliação da diversidade e distância genética. O resultado da amplificação de PCR das 13 cultivares de *hemerocallis* utilizando 10 locos microssatélites é apresentado na Tabela 20. Os 10 locos microssatélites utilizados nas análises demonstraram que a maior frequência alélica (FA) foi observada para o loco HemC18 com valor de 0,88. O número de alelos por loco (NA) variou de 2 a 8, com uma média de 4 alelos por loco. Esses resultados foram muito inferiores aos resultados obtidos por Miyake e Yahara (2006). O número de alelo por loco variou de 2 a 20, com uma média de 9,8 para *Hemerocallis fulva*, de 1 a 19, com uma média de 8,8 para *Hemerocallis citrina*. Este resultado deve-se a diferença em relação a estrutura genética dos genótipos utilizados neste trabalho.

A diversidade gênica no conjunto de amostras apresentou-se mediana, com valores médios de 0,49. Valores mínimos de 0,14 para o loco HemC8 e valor máximo de 0,80 para o loco HemC29. De acordo com a classificação de PIC (conteúdo informativo polimórfico) por Botstein *et al.* (1980), os dados revelados para o presente conjunto de dados mostram-se medianamente informativos, visto que o valor de PIC variou de 0,20 (HemC18) a 0,78 (HemC29), com média de 0,45. O baixo número de alelos por loco e o baixo valor de PIC para os locos usados no presente trabalho pode ser atribuído ao número pequeno de genótipos analisados (13 cultivares) ou também ao pequeno número de locos microssatélites utilizados (10 locos).

TABELA 20 - Frequência do alelo mais freqüente (FA), número de genótipos (NG), amostras (A), número de alelos (NA), diversidade genética (DG), conteúdo informativo polimórfico (PIC), heterozigosidade (He) e endogamia (f) para o conjunto de 13 acessos de *hemerocale* analisados em 10 locos microssatélites. Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009.

Locos	FA	N G	A	NA	DG	PIC	He	F
HemC18	0,88	3,00	13,00	3,00	0,21	0,20	0,08	0,66
HemC29	0,35	10,00	13,00	8,00	0,80	0,78	0,31	0,64
HemC31	0,62	4,00	13,00	5,00	0,56	0,51	0,08	0,87
HemC8	0,92	2,00	13,00	2,00	0,14	0,13	-	1,00
HemC22	0,35	6,00	13,00	4,00	0,72	0,67	0,38	0,50
HemC10	0,54	7,00	13,00	8,00	0,66	0,64	0,33	0,53
HemC203	0,81	3,00	13,00	3,00	0,32	0,29	0,08	0,78
HemC4	0,62	6,00	13,00	5,00	0,56	0,51	0,31	0,48
HemC16	0,54	6,00	13,00	3,00	0,59	0,52	0,23	0,63
HemC24	0,77	2,00	13,00	2,00	0,36	0,29	-	1,00
Média	0,64	4,90	13,00	4,30	0,49	0,45	0,18	0,66

Todos os locos apresentaram valores de heterogiosidade muito baixos, variando de 0,08 a 0,38, discordando de Myake e Yahara (2006) que determinaram uma variação de heterogiosidade de 0,62 a 0,95 para duas espécies de *hemerocale*. Esses resultados sugerem detecção de endogamia elevada para a espécie, o que pode ser confirmado na Tabela 20, ou a presença de alelos nulos para estes locos, que pode ocorrer devido a mutações pontuais ocorridas nos locais de anelamento dos iniciadores. Petit e Callaway (2006) descrevem que o gênero *Hemerocallis* apresenta sistema de cruzamento misto, com predomínio da fecundação cruzada. Com base nesse pressuposto, pode-se inferir que os altos níveis de endogamia

observados no presente trabalho sejam decorrentes de auto-fecundação e também de cruzamentos entre parentes.

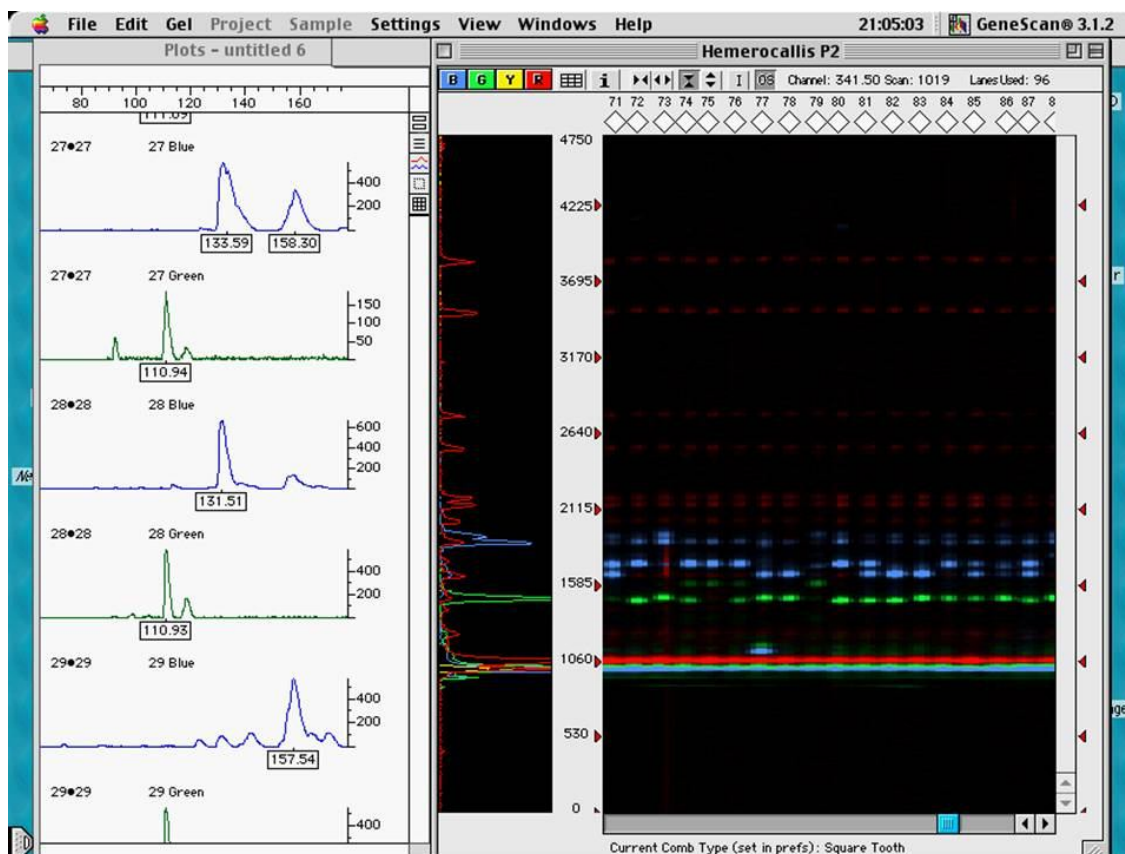


FIGURA 11 - Genotipagens em sistema semi-automatizado de locos marcados com diferentes fluorescências 6-fam (azul) e hex (verde) realizadas em 13 acessos de hemerocale. Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009.

6.3.3 SIMILARIDADE GENÉTICA E DENDROGRAMA DOS GENÓTIPOS

A matriz binária obtida dos fragmentos amplificados (Tabelas 21 e 22) fornece a porcentagem de similaridade entre as 13 cultivares de hemerocale analisadas por meio do uso de marcadores RAPD e SSR. Com isso foi possível construir um dendrograma (Figuras 12 e 13), o qual facilitou a observação da relação entre as cultivares e permitiu inferir os agrupamentos dos materiais analisados.

A média da similaridade genética obtida no presente trabalho baseada no coeficiente de Jaccard foi de 0,48 para RAPD (Tabela 21) e 0,51 para SSR (Tabela 22). Esses valores demonstram um valor médio na diferença existente entre as

cultivares. Resultados similares foram encontrados por Lanying *et al.* (2008) que avaliaram a diversidade genética de *Rhododendron*. Esses autores obtiveram também um valor de similaridade genética de 0,46 e concluíram que esse resultado refletiu em uma pequena diferença entre os acessos. Em contrapartida, valor médio superior de similaridade genética foi encontrado por Tomkins *et al.* (2001) ao estudarem o efeito de intensas hibridizações em 100 cultivares de hemerocale utilizando marcador AFLP. Esses autores obtiveram uma média de 0,80 de similaridade genética e demonstraram que as distâncias genéticas entre as cultivares analisadas foram diminuindo com o aumento das hibridizações.

Valores menores de 0,69 (RAPD) e 0,85 (SSR) de coeficiente de similaridade foram obtidos quando todas as cultivares foram comparadas entre si. A similaridade entre as cultivares 'Siloam Show Girl' (5) e 'Gentle Shepherd' (11) foi a menor com 0,22 para RAPD (Tabela 21), e para o marcador SSR, a menor similaridade foi entre as cultivares 'Caribbean Snowcap' (7) e 'Dragons Eye' (10) com 0,20 (Tabela 22). Em *Limonium* foram obtidos resultados similares para coeficiente de similaridade (0,37) entre as espécies *L. latifolium* e *L. gmelinii* que são originadas de uma mesma região (BRUNA *et al.*, 2004). Esse resultado permite inferir que estas cultivares de hemerocale são candidatas potenciais como fonte de variabilidade, e com isso pode aumentar a possibilidade de obter ganho genético por seleção, aumentando também a possibilidade de se chegar mais rápido a cultivares e híbridos com características que o mercado vem exigindo.

A maior similaridade, ou seja, a menor distância foi entre as cultivares 'Sugar Candy' (4) e 'Stolen Treasure' (8) com 0,69 para RAPD (Tabela 21), e entre as cultivares 'Siloam Nugget' (2) e 'Gentle Shepherd' (11), 'Siloam Nugget' (2) e 'Cleopatra' (12), 'Sugar Candy' (4) e 'Cleopatra' (12), e 'Double Cranberry Ruffles' (9) e 'Gentle Shepherd' (11) com 0,85 para SSR (Tabela 22). Na Tabela 15 verifica-se que de todas as cultivares citadas acima, somente a cultivar 'Double Cranberry Ruffles' informa os parentais, as demais cultivares não informam ou citam a palavra "seedling", ou seja, de pais desconhecidos. Esses resultados permitem inferir que apesar de os genótipos não informarem se apresentam parentais em comum, o alto valor de similaridade genética sugere que tais genótipos estejam relacionados ancestralmente (SHIRAN *et al.*, 2007). Com isso não se recomenda cruzamentos entre essas cultivares para um programa de melhoramento dessa espécie.

A identificação de genótipos com base somente na similaridade genética, sem considerar seus próprios desempenhos, pode não ser uma boa estratégia para um programa de melhoramento. Assim, a recomendação de cruzamentos em programas de melhoramento entre genótipos divergentes, mas que apresentem desempenho superior nas principais características de importância agrônômica, parece ser a mais indicada (CARPENTIERI-PÍPOLO *et al.*, 2000). Com base nos valores genotípicos das famílias para os caracteres número de haste (NH) e número de botões florais por planta (NBP) (dados não apresentados), observou-se que entre os nove melhores cruzamentos para esta característica, a maioria, DL 15 (8 x 13), DL 14 (13 x 8), DL 2 (1 x 12), DL 3 (12 x 1), DL 24 (9 x 10), DL 25 (10 x 9), DL 27 (6 x 4), foi proveniente de cruzamentos entre genitores que apresentaram coeficientes de similaridade baixos (Tabelas 21 e 22). Em contrapartida, verificou-se que para menores valores genotípicos para estas características, DL 19 (2 x 5), DL 12 (11 x 8), DL 20 (5 x 2), DL 30 (4 x 11), apresentaram coeficientes de similaridade elevados. Estes resultados evidenciam que a proximidade genética influenciou nos valores obtidos de ganho genético e que cruzamentos entre cultivares divergentes (não aparentados) de hemerocale podem ser explorados visando a obtenção de famílias com maior valor genotípico e conseqüentemente maior ganho genético. Resultados similares foram apresentados por Oliveria (2007), ao estudar a divergência genética em clones de cana-de-açúcar verificou que cruzamentos divergentes entre genitores, apresentaram elevados valores genotípicos para as características produtividade de massa de colmo e de açúcar em suas respectivas famílias.

TABELA 21 - Matriz de similaridade genética de 13 cultivares de hemerocale baseado em 8 iniciadores de RAPD e no coeficiente de Jaccard. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1,00												
2	0,41	1,00											
3	0,50	0,56	1,00										
4	0,52	0,59	0,58	1,00									
5	0,48	0,40	0,45	0,48	1,00								
6	0,53	0,36	0,51	0,53	0,50	1,00							
7	0,51	0,53	0,61	0,64	0,47	0,64	1,00						
8	0,35	0,53	0,66	0,69	0,47	0,60	0,68	1,00					
9	0,44	0,35	0,44	0,43	0,38	0,41	0,50	0,50	1,00				
10	0,33	0,38	0,37	0,44	0,27	0,32	0,35	0,47	0,38	1,00			
11	0,33	0,33	0,38	0,37	0,22	0,42	0,47	0,39	0,38	0,36	1,00		
12	0,33	0,37	0,45	0,44	0,28	0,36	0,47	0,51	0,47	0,53	0,52	1,00	
13	0,27	0,30	0,42	0,48	0,26	0,40	0,40	0,43	0,32	0,48	0,44	0,61	1,00

TABELA 22 - Matriz de similaridade genética de 13 cultivares de hemerocale baseado em 10 iniciadores de SSRs e no coeficiente de Jaccard. Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1,00												
2	0,45	1,00											
3	0,45	0,55	1,00										
4	0,55	0,50	0,50	1,00									
5	0,40	0,60	0,50	0,60	1,00								
6	0,50	0,50	0,39	0,28	0,44	1,00							
7	0,35	0,55	0,35	0,45	0,35	0,33	1,00						
8	0,55	0,55	0,55	0,50	0,50	0,28	0,50	1,00					
9	0,35	0,40	0,45	0,60	0,45	0,56	0,50	0,55	1,00				
10	0,35	0,50	0,45	0,50	0,35	0,39	0,20	0,40	0,45	1,00			
11	0,70	0,85	0,55	0,65	0,50	0,44	0,50	0,65	0,85	0,65	1,00		
12	0,65	0,85	0,75	0,85	0,55	0,72	0,65	0,70	0,60	0,70	0,60	1,00	
13	0,50	0,45	0,50	0,50	0,50	0,39	0,30	0,35	0,50	0,30	0,70	0,60	1,00

O coeficiente de correlação cofenética dos dendrogramas ($r = 0,81$ para RAPD e $0,75$ para SSR) revelou um bom ajuste entre a representação gráfica das distâncias e a sua matriz original (ROHLF, 2000), possibilitando a realização de inferências por meio da avaliação visual das Figuras 12 e 13. Neste tipo de representação gráfica, a eficiência com que a matriz original dos dados de distância

é representada na figura, implica diretamente a possibilidade de sua utilização (BERTAN *et al.*, 2006).

O dendrograma gerado pelo método UPGMA por meio do programa NTSYS-pc 2.02 (Figuras 12 e 13) agrupou as 13 cultivares de hemerocale para ambos marcadores em dois grupos. Para o RAPD, o primeiro grupo possui nove cultivares (1, 3, 4, 8, 7, 6, 2, 5, 9, 10) distribuídas em sete ramificações. No segundo grupo estão agrupadas quatro cultivares (10, 12, 13 e 11), em que as cultivares 12 e 13 formam um subgrupo. Essas cultivares morfológicamente apresentam igual formato de flor “aranha” e são classificadas como plantas de porte alto. O dendrograma obtido do marcador SSR o primeiro grupo possui 10 cultivares (1, 2, 11, 4, 12, 9, 8, 3, 13, 5) distribuídos em 7 ramificações. No segundo grupo está as três cultivares restantes (10, 6 e 7).

A análise comparativa dos dois dendrogramas revelou associações diferentes entre as cultivares. Uma similaridade genética de 0,85 e 0,33 entre as cultivares 2 e 11, de 0,85 e 0,37 entre as cultivares 2 e 12, de 0,85 e 0,44 entre as cultivares 4 e 12 e de 0,85 e 0,38 entre as cultivares 9 e 11 foi observada com marcadores SSR e RAPD, respectivamente. Havendo, portanto maior eficiência do marcador SSR na identificação da similaridade genética entre as cultivares estudadas. Resultados semelhantes foram verificados na análise genética de *Malpighia emarginata* D.C. (SALLA *et al.*, 2002), por outro lado, Van de Ven e McNicol (1996) mostraram que o marcador RAPD foi mais preciso na identificação de acessos de *Picea sitchensis*. Uma possível explicação para tal resultado talvez seja o tipo de informação revelada por cada marcador. Marcadores RAPD são distribuídos ao acaso no genoma e largamente em regiões intergênicas. Em contraste, os marcadores SSR detectam sítios pré-determinados, podendo ser provenientes de regiões não traduzidas e de íntrons, por exemplo (GHISLAIN, *et al.*, 2006).

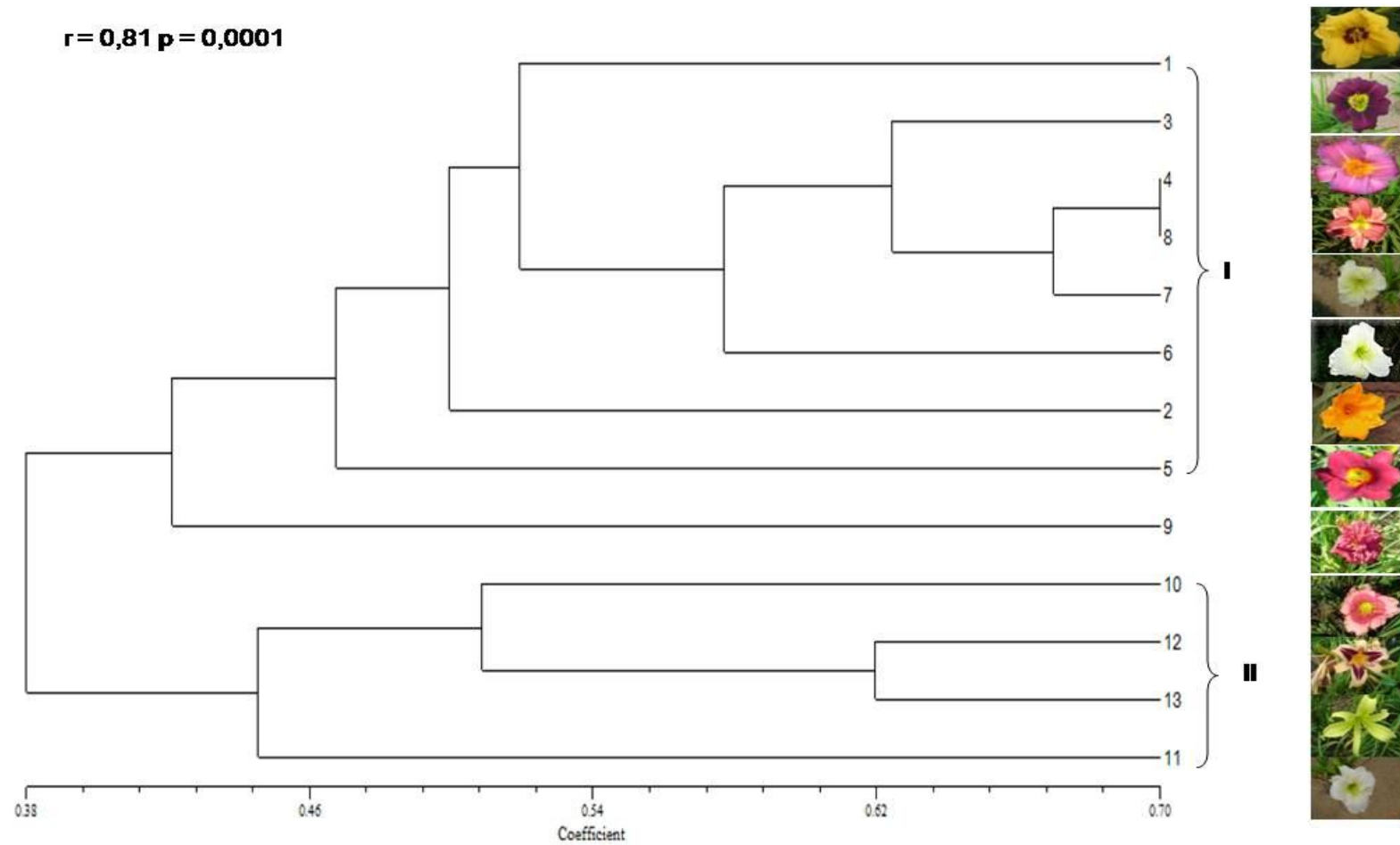


FIGURA 12 - Dendrograma de similaridade genética de 13 cultivares de hemerocale, obtido pela análise de agrupamento UPGMA, com base no coeficiente de Jaccard, utilizando marcadores RAPD. Laboratório de Horticultura Ornamental, Homestead, FL, 2008.

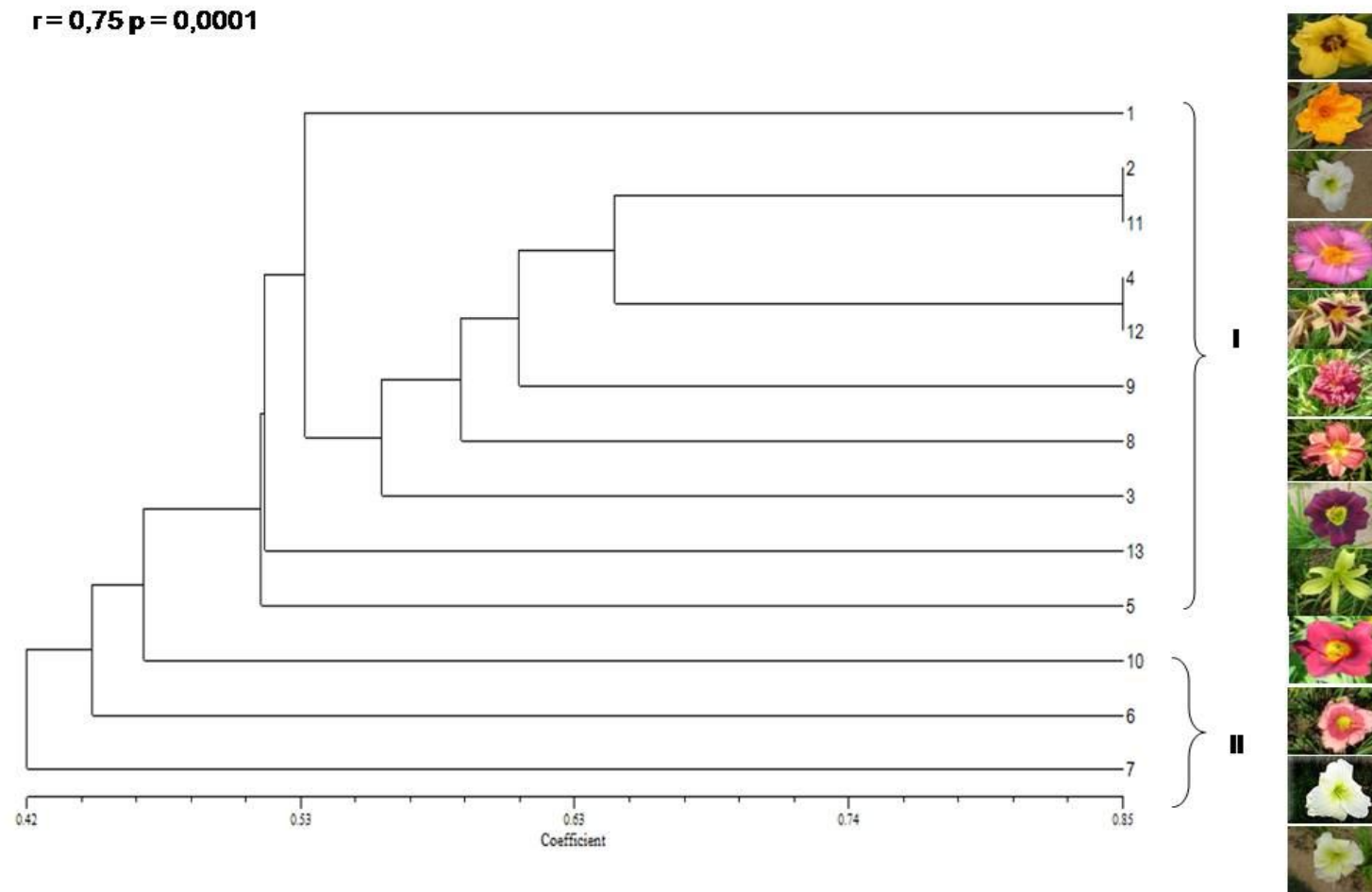


FIGURA 13 - Dendrograma de similaridade genética de 13 cultivares de hemerocale, obtido pela análise de agrupamento UPGMA, com base no coeficiente de Jaccard, utilizando marcadores SSR. Laboratório de Genética Vegetal, Brasília, DF, 2009.

6.4 CONCLUSÕES

A média de similaridade genética obtida no presente trabalho baseada no coeficiente de Jaccard foi de 0,48 para RAPD e 0,51 para SSR.

Dentre os marcadores testados, SSR foi mais eficiente na identificação de similaridade genética entre as cultivares estudadas.

A proximidade genética influenciou nos valores obtidos de ganho genético e as melhores famílias foram obtidas entre cruzamentos de cultivares divergentes.

O dendrograma gerado pelo método UPGMA dividiu as 13 cultivares de *hemerocale* em dois grupos para os dois marcadores testados.

6.5 REFERÊNCIAS

American Hemerocallis Society (AHS). Disponível em: <http://: www.daylilies.org.> Acesso em 15 de out. de 2004.

ANASTASSOPOULOS, E.; KEIL, M. Assessment of natural and induced genetic variation in *Alstroemeria* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Euphytica**, v.90, p. 235-244, 1996.

APPLIED BIOSYSTEMS – PE. **AFLP Plant Mapping Protocol**. 1997. 45p.

BAYDAR, N.G.; BAYDAR, H.; DEBENER, T. Analysis of genetic relationships among *Rosa damascena* plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers. **Journal of Biotechnology**, v. 111, p. 263-267. 2004.

BECHER, S. A.; STEINMETZ, K.; WEISING, K.; BOURY, S.; PELTIER, D.; RENOU, J. P.; KAHL, G.; WOLFF, K. Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. **Theoretical Applied Genetics**, v. 101, p. 643-651, 2000.

BENEDETTI, L. De; BURCHI, G.; MERCURI, A.; PECCHIONI, N.; FACCIOLI, P.; SCHIVA, T. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for the verification of hybridity in interspecific crosses of *Alstroemeria*. **Plant Breeding**, Wissenschafts-Verlag, n.119. p. 443-445. 2000.

BERTAN, I.; CARVALHO, F. I. F de.; OLIVEIRA, A. C. de; VIEIRA, E. A.; HARTWIG, I.; SILVA, L. A. G. da; SHIMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; BUSATO, C. C.; RIBEIRO, G. Comparação de métodos de agrupamento na representação da distância morfológica entre genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 3, p. 279-286, 2006.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas**. 4 ed. Viçosa: UFV, 2005, 525p.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BOWCOCK, A. M.; RUIZ-LINARES, A.; THOMFOHRDE, J.; MINCH, E.; KIDD, J. R.; CAVALLI-SFORRA, L. L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. **Nature**, v. 368, p. 455-457, 1994.

- BRUNA, S.; BENEDETTI, L. de.; MERCURI, A.; SCHIVA, T.; BURCHI, G.; PECCHIONI, N.; AGRIMONTI, C. Use of RAPD for the genetic characterization of *Limonium* species. **Acta Horticulture**, v 651, p. 155-160, 2004.
- BURKE, J. M.; ARNOLD, M. L. L. Isolation and characterization of microsatellites in iris. **Molecular Ecology**, v.8, p. 1075-1092, 1999.
- BUSO, G. S. C. O.; CIAMPI, A. Y.; MORETZOHN, M. de C.; AMARAL, Z. P. de S. **Protocolo para desenvolvimento de microssatélites**. Circular Técnica, n. 20, Brasília, DF, 2003.
- BUSSEL, J. D.; WAYCOTT, M.; CHAPPILL, J. A. Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematic**, Germany, v.7, p.3-36, 2005.
- CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; DESTRO, D.; CAVENAGHI PRETE, C. E.; GONZALES, M. G. N.; POPPER, I.; ZANATTA, S.; SILVA, F. A. M. da. Seleção de genótipos parentais de acerola com base na divergência genética multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 1613- 1619, 2000.
- CHAKRABARTY, D.; GUPTA, V. N.; DATTA, S. K. Varietal identification and assessment of genetic relationships in *Hippeastrum* using RAPD markers. **Plant Biotechnology Reports**, Japan, n.1. p.211-217. 2007.
- CHUNG, Y.; KIM, H.; KIM, K.; PARK, S.; YI, Y.; LEE, J.; KWON, O. Morphological characteristics and genetic variation of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort). **Journal of Plant Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 145-149, 2001.
- COELHO, A. S. G. BOOD - **Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap**, Versão 3.0. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2001.
- DALLAVALLE, E.; D'AURELERIO, A. Z.; VERARDI, E.; BERTACCINI, A. Detection of RAPD Polymorphisms in *Gladiolus* cultivars with differing sensitivities to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Gladioli*. **Plant Molecular Biology Reporter**, Canadá, v 20, p. 305a – 305f, 2002.
- ERHARDT, W. **Hemerocallis Daylilies**. Portland, Oregon: Timber Press, 1992, 160p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

GISLAIN, M.; RODRIGUEZ, F.; VILLAMON, F.; NUNEZ, J.; WAUGH, R.; BONIERBALE, M. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. **Research on potato**: CIP program report. (S.1:s.n.), p. 167-174, 2000.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLFTTERER, C. Microsatellites: Evolution and Applications. **Oxford University Press**, New York. 1999. 368 p.

GUPTA, P. K.; BALYAN, H. S.; SHARMA, P. C.; RAMESH, B. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. **Current Science**, v. 70, n. 1, p. 45-54, 1996.

HONG, C. J.; ARISUMI, K. I.; ETOH, T. RAPD Analysis of ornamental *Alliums* for phylogenetic relationship. **Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ**, v.32, p. 51-58, 1996.

HORNING, M. E.; MALONEY, S. C.; WEBSTER, S. Isolation and characterization of variable microsatellite loci in *Lilium philadelphicum* (Liliaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 412-413, 2003.

HUGHES, M.; HOLLINGSWORTH, P. M., SQUIRRELL, J. Isolation of polymorphic microsatellite markers for *Begonia sutherlandii* Hook.f. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 185-186, 2002.

IDURY; CARDON. A simple method for automated allele: Binning microsatellites markers. **Genome Research**, v. 11, p. 1104-1109, 1997.

ISAGI, Y.; HONJO, M., WASHITANI, I. Development of microsatellite markers for *Primula sieboldii* using degenerate oligonucleotide-primed PCR-amplified DNA. **Molecular Ecology**, v. 1, p. 22-24, 2001.

JAN, C. H., BYRNE, D. H., MANHART, J., WILSON, H. Rose germoplasm analysis with RAPD markers. **Hort Science**, United States, v.34, n. 2, p.341-345, 1999.

JONES, C. J.; EDWARDS, K. J.; CASTAGLIONE, S.; WINDIELD, M.O.; SALA, F.; WIEL, C.; VAN DE BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATHES, M.; DALY, A.; BRETTSCHEIDER, R.; BETTINI, P.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSCHI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VASQUEZ, A.; KARP, A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in

plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 381-390, 1997.

KO, M. K.; YANG, Y. H.; LEE, C. H.; OH, B. J. Genetic relationship of *Viola* species evaluated by random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.73, n.5, p.601-605, 1998.

LANYING, Z.; YONGQING, W.; LI, Z. Genetic diversity and relationship of *Rhododendron* species based on RAPD analysis. **American – Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 3, n. 4, p. 626-631, 2008.

MEEROW, A. W. Molecular Genetic Characterization of New Floricultural Germplasm. **Acta Horticulturae**, ISHS, v. 683, p. 43-63, 2005.

MILACH, S. C. K. **Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares**. Borém, Giudice, Sakiyama, Sedyama, Moreira, Portugal (eds.). Biossegurança, proteção de Cultivares, Acesso aos Recursos Genéticos e Propriedade industrial na Agropecuária. Viçosa, 1998. 182p. Disponível *online* em <http://www.embrapa.br>. Acessado em 24/05/08.

MIYAKE, T.; YAHARA, T. Isolation of polymorphic microsatellite loci in *Hemerocallis fulva* and *Hemerocallis citrine* (Hemerocallidaceae). **Molecular Ecology**, v. 6, p. 909-9011, 2006.

MOREIRA, J. A. N.; SANTOS, J. W.; OLIVEIRA, S. R. M. **Abordagens e metodologias para avaliação de germoplasma**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 115p.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v. 3, p. 175-182. 1993.

NAITO, K. ISAGI, I., NAKAGOSHI, N. Isolation and characterization of microsatellites of *Rhododendron matternichii* Sieb. Et Zucc. Var *hondoense* Nakai. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 927-928, 1998.

OLIVEIRA, R de O. **Seleção de famílias de maturação precoce em cana-de-açúcar via REML/BLUP**. Curitiba : 2007. 127p. Tese (Doutorado em Agronomia, Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná.

PERSSON, H. A.; LUNDQUIST, K.; NYBOM, H. RAPD anlysis of genetic variation within and among populations of Turk's cap lily (*Lilium martagon* L.). **Hereditas**, v. 128, p. 213-220, 1998.

PETIT, T. L.; CALLAWAY, D. J. Breeding Daylilies (*Heemerocallis hybrida*). In: CALLAWAY, D. J.; CALLAWAY, M. B. (Ed.). **Breeding Ornamental Plants**. Portland, Oregon: Timber Press, p. 19 – 37, 2000.

PRASAD, M.; VARSHNEY, R. K.; ROY, J. K.; BALYAN, H. S. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 584-592, 2000.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Science**, v. 1, p. 215–222. 1996.

QIAGEN - **DNeasy Plant Mini Kit Protocol**. 2006. 50.

ROHLF, J. F. **NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.1**. New York : Exeter Software, 2000.83p.

RUSSELL, J.; FULLER, J.; YOUNG, G.; THOMAS, B.; TARMINO, G. MACAULAY, M.; WAUGH, R. and POWELL, W. Direct comparison of levels of genetic variation among barely accessions detected by RFLPs, AFLPs, SRRs and RAPDs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 45, p. 714-722. 1997.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 15-22, 2002.

SHIRAN, B., AMIRBAKHHTIAR, N.; KIANI, S.; MOHAMMADI, Sh.; SAYED-TABATABAEI, B. E.; MORADI, H. Molecular characterization and genetic relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 280-292, 2007.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods, **Taxonomy**, v.11, n.1, p. 30-40, 1962.

STOUT, A. B.; CHANDLER, C. Pollen-tube behavior in *Heemerocallis* with special reference to incompatibilities. **Bulletin of the Torrey Club**, Lawrence, v. 60, p. 397-417, 1933.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TAYWIYA, P.; BUNDITHYA, W.; POTAPOHN, N. Analysis of genetic relationship of the genus *Phalaenopsis* by RAPD technique. **Acta Horticulture**, Belgium, v. 788, p. 39-45, 2008.

TESTOLIN, R.; MARRAZZO, T.; CIPRIANI, G.; QUARTA, R.; VERDE, I.; DETTORI, M.T.; PANCALDI, M.; SANSAVINI, S. Microsatellite in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. **Genome**, v. 43, p. 512-520, 2000.

TOMKINS, J. P.; WOOD, T. C.; BARNERS, L. S.; WESTMAN, A. Evaluation of genetic variation in the daylily (*Heemerocallis* spp.) using AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, n. 102. p. 489-496. 2001.

VAN de VEN, W. T.G.; McNICOL, R. L. Microsatellites as DNA markers in *Sitka spruce*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 613-617, 1996.

VARSHNEY, R. K.; SIGMUND, R.; BORNER, A.; KORZUN, V.; STEIN, N.; SORRELLS, M. E.; LAN GRIDGE, P.; GRANER, A. Interespecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. **Plant Science**, v. 168, p. 195-202, 2005.

WOLF, K. e PETERS VAN R. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendrathera grandiflora* Tzvelev) using random iniciadores. **Heredity**, v. 71, p. 335-341, 1993.

YAMAMOTO, H.; YAMADA, T.; MAKI, M. Isolation and characterization of microsatellite markers from the hosta species *Hosta albomarginata* (Liliaceae). **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 185-187. 2008.

ZIEGLE, J. S.; SU, Y.; CORCORAN, K. P.; NIE, L.; MAYRAND, P. E.; HOFF, L. B.; MCBIDE, L. J.; KRONICK, M. N. AND DIEHL, S. R. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. **Genomics**, v. 14, p. 1026–1031, 1992.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

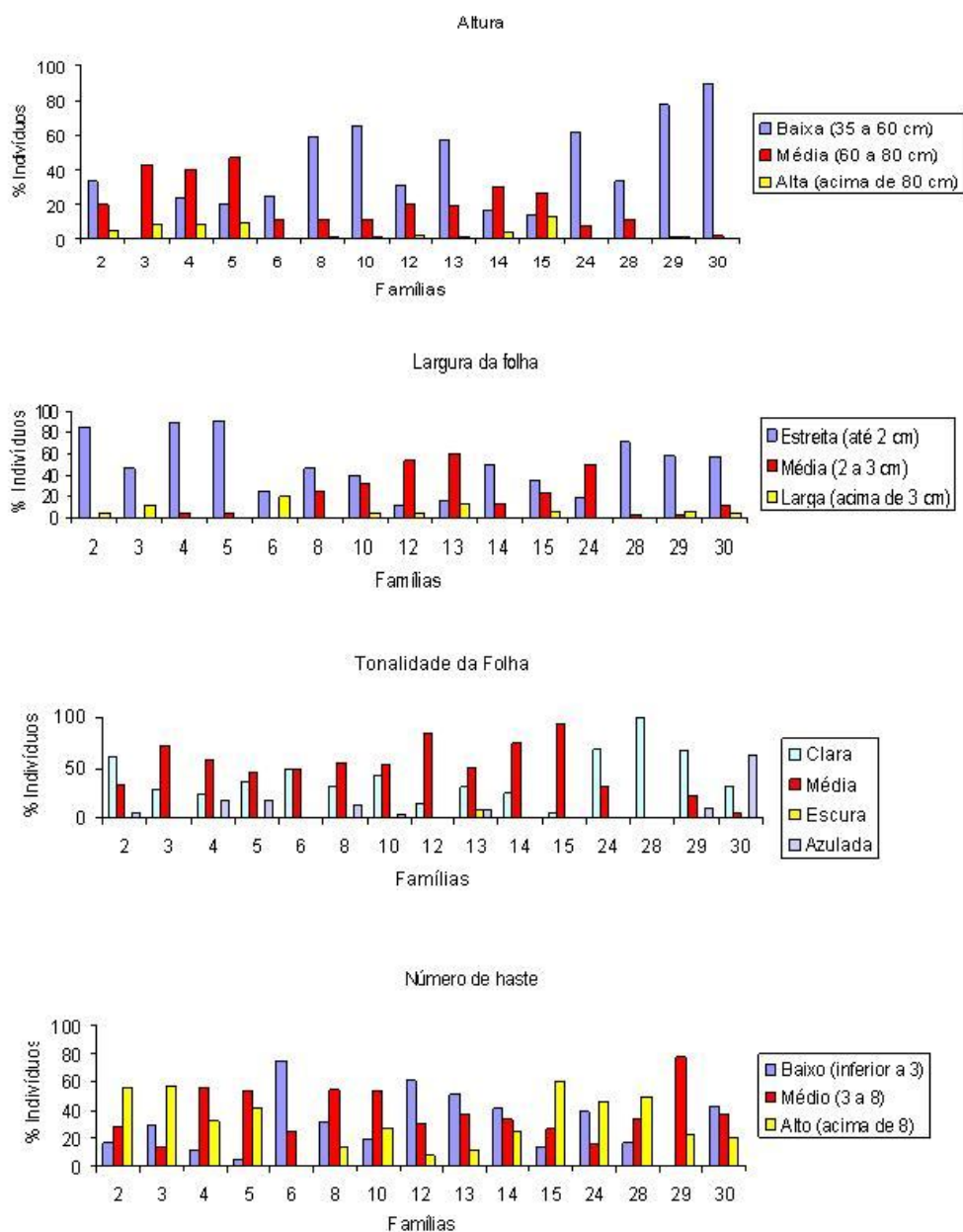
Apesar de hibridizações em *hemerocale* terem sido feitas por muitos anos, cruzamentos entre algumas cultivares comerciais apresentam certa dificuldade em produzir frutos, portanto, sugere-se a realização de estudos testando a fertilidade do estigma, viabilidade de pólen e a ocorrência de processos de incompatibilidade.

Com relação aos parâmetros genéticos, os resultados revelaram que a seleção de famílias proporcionou a maior eficiência seletiva em *hemerocale*, e consequentemente ganhos genéticos para alguns caracteres. Esses resultados poderão ser usados a fim de facilitar uma seleção adequada dos progenitores que dêem origem a progênie com os caracteres desejados. Porém, sugere-se para estudos futuros a identificação e a investigação de genes que controlam as características quantitativas, utilizando o método de mapeamento QTL (“Quantitative Trait Loci”).

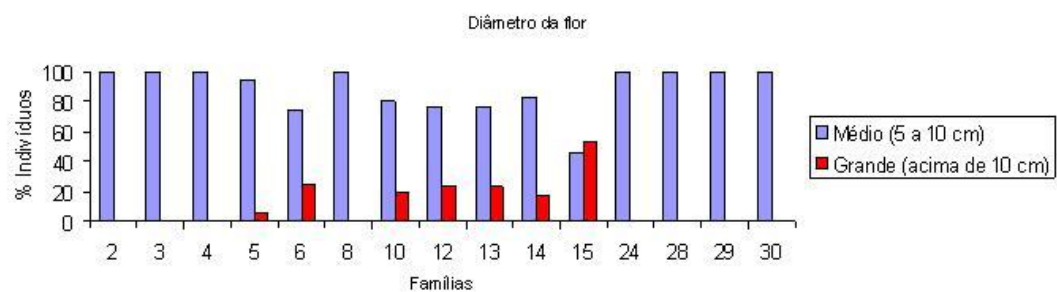
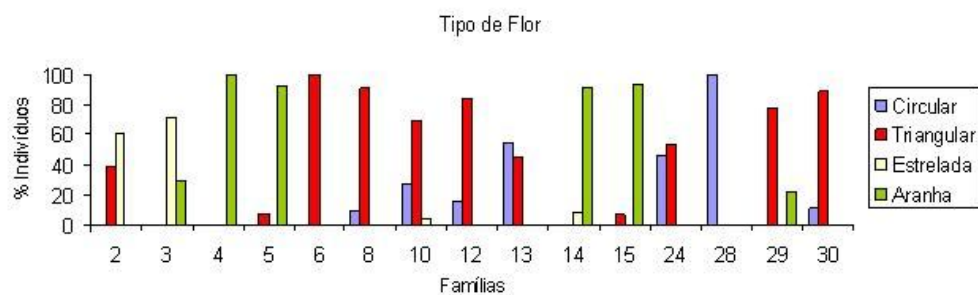
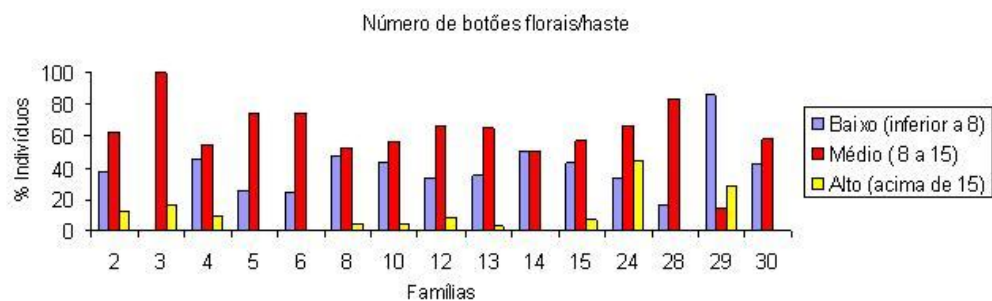
Para o estudo citogenético, foi possível determinar uma metodologia eficiente para realizar a contagem de cromossomos de *hemerocale*. Essa metodologia poderá ser utilizada para outras cultivares, visto que existe uma certa dificuldade em encontrar dados referentes sobre a ploidia das mesmas. Porém, vale destacar que para um número maior de amostras recomenda-se testar e padronizar um protocolo de outra técnica, análise por citometria de fluxo do conteúdo nuclear de DNA, a qual vem se tornando popular na estimativa de ploidia.

No estudo da relação genética entre as cultivares foi possível indicar algumas cultivares como candidatas potenciais como fonte de variabilidade e descartar algumas hibridizações. Assim, o estudo de similaridade genética mostrou-se bastante útil para o planejamento de cruzamentos para produção de novas cultivares. Estudos futuros podem ser realizados utilizando os marcadores moleculares, como por exemplo, a caracterização de cultivares com fins de proteção, e o monitoramento de fecundações cruzadas e autofecundações.

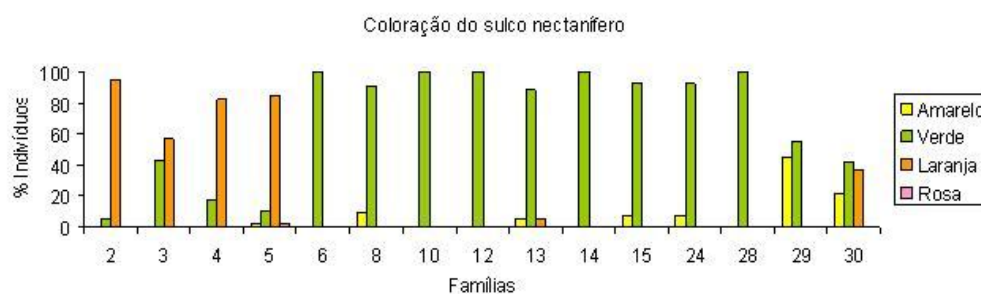
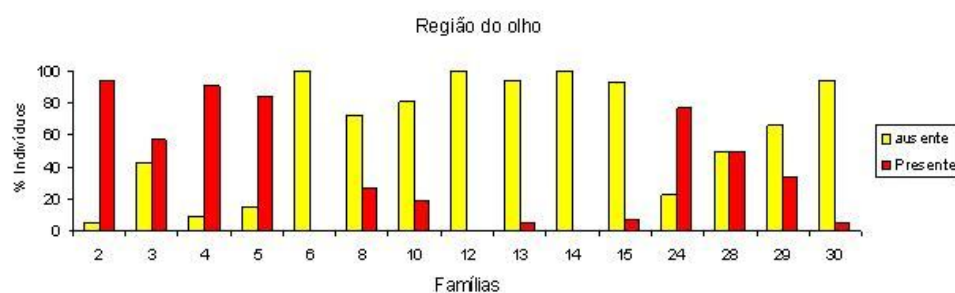
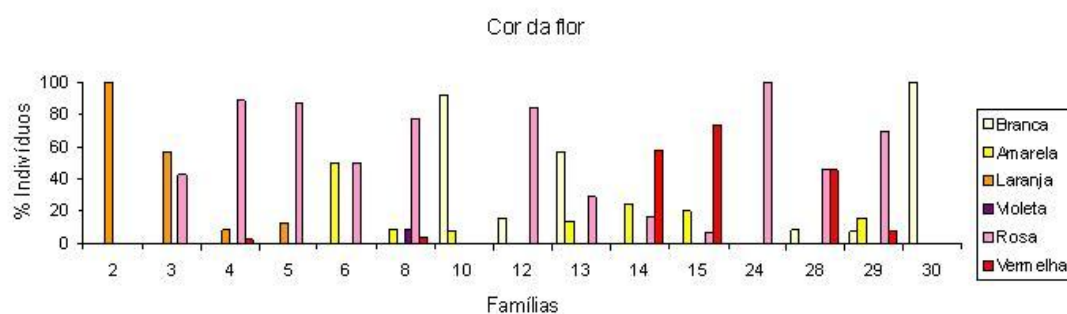
ANEXOS



ANEXO 1 - Altura da planta, largura e tonalidade da folha e número de hastes avaliadas em 15 famílias de hemerocale. Joinville, SC, 2007.



ANEXO 2 - Número de botões florais por haste, tipo e diâmetro da flor avaliadas em 15 famílias de hemerocale. Joinville, SC, 2007.



ANEXO 3 - Cor da flor, região do olho e coloração do sulco nectarífero avaliadas em 15 famílias de hemerocale. Joinville, SC, 2007.